Charles University
1st Faculty of Medicine

Study section: Biomedicine
Academic programme: Biochemistry and Pathobiochemistry

MUDr. Hana Kolářová

Studium vývojových, patobiochemických a molekulárních aspektů vybraných dědičných metabolických poruch

Developmental, pathobiochemical and molecular aspects of selected inborn errors of metabolism

Ph.D. Thesis

Supervisor: doc. MUDr. Tomáš Honzík, Ph.D.

Prague, 2017

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 2017

MUDr. Hana Kolářová

Podpis:

Identifikační záznam:

KOLÁŘOVÁ, Hana. Studium vývojových, patobiochemických a molekulárních aspektů vybraných dědičných metabolických poruch. [Developmental, pathobiochemical and molecular aspects of selected inborn errors of metabolism]. Praha, 2017. 115 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Klinika dětského a dorostového lékařství. Vedoucí závěrečné práce: doc. MUDr. Tomáš Honzík, Ph.D.

Identification record:

KOLÁŘOVÁ, Hana. Developmental, pathobiochemical and molecular aspects of selected inborn errors of metabolism [Studium vývojových, patobiochemických a molekulárních aspektů vybraných dědičných metabolických poruch]. Prague, 2017. 115 pages. Ph.D. thesis. Charles University, First Faculty of Medicine, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine. Supervisor: Assoc. Prof. Tomáš Honzík, M.D., Ph.D.

ABSTRAKT

Dědičné poruchy metabolismu představují heterogenní skupinu vzácných onemocnění, jež obvykle postihují méně než 1 na 100 000 živě narozených dětí. Vzhledem k jejich nízké prevalenci zůstávají často na okraji zájmu základního i aplikovaného výzkumu farmaceutických společností. Studium vzácných onemocnění představuje jediný způsob jak zlepšit prognózu pacientů.

Předkládaná dizertační práce se věnuje především problematice poruch mitochondriálního metabolismu. Jejím záměrem bylo charakterizovat mitochondriální biogenezi během fetálního období a v průběhu dětského i dospělého věku. Další část se zabývá studiem mitochondriálních neuropatií optiku na klinické, biochemické a molekulárně-genetické úrovni.

Tato práce významně podpořila dřívější nález, že 22. gestační týden je kritickou periodou pro viabilitu plodu, což je nutno zvážit především při tvorbě doporučení pro resuscitaci nedonošených novorozenců. Další přínosem byla charakterizace velkého souboru pacientů s neuropatiemi optiku na podkladě mitochondriální dysfunkce. Podařilo se nám charakterizovat více než 200 pacientů na biochemické a molekulárně-genetické úrovni, kteří byli popsáni jak v kazustických sděleních (LHON/MELAS překryvný syndrom), tak i v mezinárodních kohortových studiích (MELAS, DOA, extraokulární příznaky LHON). Hlavním přínosem této práce je především aplikace teoretických poznatků v klinické praxi. V roce 2013 se nám podařilo založit ***Národní centrum pro pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku*** s cílem poskytnout nejlepší péči pro naše pacienty, optimalizovat diagnosticko-terapeutické postupy a (pre-) klinický výzkum těchto onemocnění.

Klíčová slova: mitochondrie, biogeneze, vývoj, mitochondriální neuropatie optiku, Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON)

ABSTRACT

Inborn errors of metabolism represent a heterogenous group of rare conditions, most having an incidence of less than 1 in 100,000 births. Because of their low prevalence, they are on the margin of attention of general research and even more so of large pharmaceutical companies. Study of rare diseases is the only way to design therapeutic options in order to improve quality of life of affected patients.

Present Thesis particularly focuses on disturbances in mitochondrial energy metabolism. The main goals were the characterization of mitochondrial biogenesis within foetal development, as well as in childhood and adulthood. Another aim was to define clinical, biochemical and molecular aspects of mitochondrial optic neuropathies in childhood and adulthood.

This work supported the earlier observations that gestational week 22 is the edge of viability, which has to be taken into account in upcoming discussions about guidelines on resuscitation of preterm neonates. Secondly, over last four years, we managed to examine and describe large cohort of patients with optic neuropathies based on a mitochondrial dysfunction. We have managed to characterize the biochemical and molecular-genetic background in more than 200 patients, and both selected cases (LHON/MELAS overlap syndrome) and cohort studies (MELAS, DOA, LHON *plus*) were published, bringing novel phenotype and genotype findings. Finally, the main contribution of this Thesis was the application of our results and experience in clinical practice. In 2013, we succeeded in creating a ***National Center for Patients with Mitochondrial Optic Neuropathies*** in order to bring the best care to patients with rare mitochondrial optic diseases, to improve diagnostic tools and to harmonize (pre-) clinical research.

Key words: mitochondrion, biogenesis, development, mitochondrial optic neuropathies, Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON)

ACKNOWLEDGEMENTS

Firstly, I would like to express my sincere gratitude to my supervisor Ass. Prof. Tomáš Honzík, M.D., Ph.D. for accepting nothing less than excellence from me. His immense knowledge, motivation and guidance helped me not only in all the time of research, but also during my fellowship in pediatrics. I could not have imagined having a better advisor for my studies.

I am extremely grateful to Ing. Markéta Tesařová, Ph.D. for having her door open whenever I ran into a last minute trouble spot or had a question about our research or writing. I would also like to thank Prof. Jiří Zeman, M.D., D.Sc. who always made me think in the right way and contributed greatly to my intellectual growth in medicine. My sincere thanks also goes to RNDr. Hana Hansíková, CSc., who provided me with an opportunity to join her team as a researcher, and who gave me access to the laboratory and research facilities.

Special thanks belongs to my family who have provided me through continuous support of my Ph.D. studies and my life in general. They always had the clearest perspective on my experiences and abilities and have helped me spiritually but also intelectually in all possible ways. Without their precious support and patience it would not be possible to conduct my research.

I would like to thank my colleagues and fellow students from the Department of Pediatrics and Adolescent Medicine and Laboratory for Study of Mitochondrial Disorders, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague for their feedback, cooperation and friendship. In addition, I would like to express my gratitude to my colleagues from the Ophthalmology and Neurology Department who were involved in the creation of the National Center for Patients with Mitochondrial Optic Neuropathies.

Last but not least, I would like to thank to the families of our patients for their wonderful loving care and commitment.

This Ph.D. Thesis was completed during the author's doctoral studies in biomedical sciences at the 1st Faculty of Medicine, Charles University, between years 2013-2017. The studies involved in this Thesis were elaborated within projects supported by the following grants: Charles University institutional programs GAUK 38515, UNCE 204011, PRVOUK-P24/LF1/3 and SVV - UK 260256/2016, 260367/2017. Specific support was provided by grant AZV 16-32341A and VFN RVO 64165 from the Ministry of Health of the Czech Republic and 14-36804G from the Czech Science Foundation.

TABLE OF CONTENTS

1 INTRODUCTION 15
1.1 Rare diseases 15
1.2 Mitochondria 17
1.2.1 Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) 17
1.2.2 Mitochondrial genome 22
1.2.3 Mitochondrial gene expression and its regulation 22
1.3 Mitochondrial biogenesis; liver and muscle development 24
1.3.1 Embryonic and foetal metabolism 25
1.3.1.1 The oocyte selection, pre- and postcompaction stage 25
1.3.1.2 The placentation period 26
1.3.1.3 Preparation to early postnatal adaptation 27
1.3.2 Muscle development 28
1.3.3 Liver development, haematopoiesis 29
1.4 Clinical presentation of MD 30
1.4.1 Diagnostics of MD 34
1.4.2 MELAS syndrome 39
1.5 Optic neuropathies 40
1.5.1 Inherited optic neuropathies, mitochondrial optic neuropathies (MON) 40
1.5.2 Disease mechanisms of LHON and DOA 41
1.5.3 LHON 42
1.5.3.1 Etiology 42
1.5.3.2 Clinical presentation 43
1.5.3.3 Extraocular presentation and LHON plus 45
1.5.4 DOA 46
1.5.4.1 Etiology 46
1.5.4.2 Clinical presentation 48
1.5.5 Therapeutic management of LHON and DOA 49
2 AIMS OF THE THESIS 51
3 MATERIALS AND METHODS 53
3.1 Materials 53
3.1.1 Related to the aim A) Mitochondrial biogenesis 53

3.1.2 Related to the aim B) Mitochondrial optic neuropathies 53
3.1.2.1 Patients 53
3.1.2.2 Clinical samples 54
3.1.3 Related to the aim C) Pathobiochemical and molecular aspects of selected inherited errors of metabolism 55
3.1.3.1 Patients 55
3.1.3.2 Samples 55
3.2 Methods 55
3.2.1 Tissue homogenization 55
3.2.2 Isolation of mitochondria 55
3.2.3 Respiratory enzyme activities 56
3.2.4 MtDNA content 56
3.2.5 DNA isolation 56
3.2.6 Molecular genetic analyses 56
3.2.7 Interpretation of the *OPA1* mutation pathogenicity 57
3.2.8 Haematopoiesis 57
3.2.9 Enzyme histochemistry 58
3.2.10 Ophthalmic and neuroopthalmic examination 58
3.2.11 Peripapillary microcirculation in LHON 58
3.2.12 LPL concentration 59
3.2.13 Analysis of Apolipoprotein C-III and transferrin by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 59
3.2.14 Analysis of ApoC-III by MALDI TOF mass spectrometry 59
3.2.15 Statistical methods 59
4 RESULTS AND DISCUSSION 60
4.1 Related to aim A) Mitochondrial biogenesis 60
4.1.1 Developmental changes of COX, CS, SQR and mtDNA in human foetal tissues 61
4.1.2 Age and gender-related differences in mtDNA content and COX, CS and SQR activities in postnatal life 66
4.2 Related to aim B) Mitochondrial optic neuropathies 71
4.2.1 Extraocular features in LHON 73
4.2.2 Peripapillary microcirculation in LHON 75
4.2.3 Sequence of symptoms in 50 Czech m.3243A>G carriers 78

4.2.4 Unique presentation of LHON/MELAS syndrome based on m.13046T>C 82
4.2.5 Molecular genetic analysis of *OPA1* in 44 probands with optic atrophy.....84
4.2.6 MON – optimization of centered care.....86
4.2.7 Ocular gene therapies in patients with inherited retinal disorders.....88
4.3 Related to aim C) Pathobiochemical and molecular aspects of selected rare inherited errors of metabolism in children 90
4.3.1 Characterization of three patients with LPL Deficiency.....91
4.3.2 Aberrant ApoC-III glycosylation in GSD 92
5 CONCLUSION 94
6 REFERENCES 95
7 SUPPLEMENTS.....116

ABBREVIATIONS

ApoC-III: Apolipoprotein C-III

ATP: Adenosine Triphosphate

BCVA: Best-Corrected Visual Acuity

CDG: Congenital Disorders of Glycosylation

COX: Cytochrome *c* Oxidase

CPEO: Chronic Progressive External Ophthalmoplegia

CS: Citrate Synthase

CSF: Cerebrospinal Fluid

DOA: Dominant Optic Atrophy

ECG: Electrocardiogram

ERG: Electroretinography

EMG: Electromyography

ERN-Eye: The European Reference Network on Eye

EVS: Exome Variant Server

ExAC: Exome Aggregation Consortium

$FADH_2$: Flavin Adenine Dinucleotide

GSD: Glycogen Storage Diseases

GTP: Guanosine Triphosphate

GW: Gestational Week

HSP: Heavy Strand Promoter

HTG: Hypertriglyceridemia

IEF: Isoelectric Focusing

KSS: Kearns-Sayre Syndrome

LCA2: Leber Congenital Amaurosis 2

LHON: Leber Hereditary Optic Neuropathy

LPL: Lipoprotein Lipase

LSP: Light Strand Promoter

MD: Mitochondrial Disorders

MELAS: Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, LacticAcidosis & Stroke-Like episodes

MERRF: Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibres

MetabERN: European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders

MIDD: Maternally-Inherited Diabetes and Deafness

MNGIE: Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy

MON: Mitochondrial Optic Neuropathies

MS: Mass Spectrometry

mtDB: Human Mitochondrial Genome Database

mtDNA: Mitochondrial DNA

NADH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide

NARP: Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa

nDNA: Nuclear DNA

NGS: Next-Generation Sequencing

NQR: NADH-Ubiquinone Oxidoreductase

O_H: Origin of Heavy Strand Synthesis

O_L: Origin of Lagging Strand Synthesis

OXPHOS: Oxidative Phosphorylation System

PCR: Polymerase Chain Reaction

POLG: Polymerase γ

QCCR: Cytochrome *c* Oxidoreductase

rAAV2-ND4: Recombinant Adeno-Associated Virus 2 Carrying ND4

RGC: Retinal Ganglion Cells

RNFL: Retinal Nerve Fiber Layer

ROS: Reactive Oxygen Species

SD-OCT: Spectral-Domain Optical Coherence Tomography

SD-OCT-A: Spectral-Domain Optical Coherence Tomography-Angiography

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SLE: Stroke-Like Episodes

SQR: Succinate Coenzyme Q Reductase

TF: Transferrin

TFAM: Mitochondrial Transcription Factor A

UEC: Urothelial Epithelial Cells

VEP: Visual Evoked Potentials

WES: Whole Exome Sequencing

Title of the thesis: Developmental, pathobiochemical and molecular aspects of selected inborn errors of metabolism

The Thesis is based on the following articles:

Supplement 1] *Magner, M., **Kolarova, H.**, Honzik, T., Svandova, I., Zeman, J. (2015) **Clinical manifestation of mitochondrial diseases.** Dev Period Med 19(4), 441-9.*

Supplement 2] *Magner, M., **Kolářová, H.**, Honzík, T. **Pokroky v léčbě dědičných metabolických poruch s neurologickou symptomatologií.** Neurol prax (accepted).*

Supplement 3] ***Kolarova, H.**, Krizova, J., Hulkova, M., Hansikova, H., Hulkova, H., Smid, V., Zeman, J., Honzik, T., Tesarova, M. **Changes in transcription pattern lead to a marked decrease in COX, CS and SQR activity after the developmental point of the 22nd gestational week.** Physiol Res 67 (in press). IF 1,643*

Supplement 4] *Hulkova, M., Krizova, J., **Kolarova, H.**, Berankova, K., Zeman, J., Hansikova, H., Tesarova, M. (2017) **Sex differences in mtDNA content and its effect on mitochondrial enzyme activities in the context of human skeletal muscle aging.** Aging Dis (submitted).*

Supplement 5] ***Kolarova, H.** et al. **Extraocular features may be the essential presentation in m.11778G>A LHON carriers**. (Multicenter study - publication in preparation).*

Supplement 6] *Kousal, B., **Kolarova, H.**, Meliska, M., Bydzovsky, J., Kulhanek, J., Honzik, T., Liskova, P. **Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy.** JAMA Ophthalmol (submitted).*

Supplement 7] *Dvorakova, V., **Kolarova, H.**, Magner, M., Tesarova, M., Hansikova, H., Zeman, J., Honzik, T. (2016) **The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers.** Mol Genet Metab 118(4), 288–295. IF 3.093*

Supplement 8] ***Kolarova, H.**, Liskova, P., Tesarova, M., Vidrova, V.K., Forgac, M., Zamecnik, J., Hansikova, H., Honzik, T. (2016) **Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5.** Ophthal Genet 19, 1-5. IF 1.455*

Supplement 9] *Liskova, P., Tesarova, M., Dudakova, L., Svecova, S., **Kolarova, H.**, Honzik, T., Seto, S., Votruba. M. (2016) **OPA1 analysis in a series of 44 probands with optic atrophy.** Acta Ophtalmol 95(4), 363-369. IF 3,032*

Supplement 10] ***Kolarova, H.**, Honzik, T., Dudakova, L., Kousal, B., Kulhanek, J., Diblik P., Tesarova M., Havrankova P., Forgac M., Zeman J., Liskova P. (2017) **Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON)** Cesk Slov Neurol N 80/113(5), 534-544. IF 0,209*

Supplement 11] *Dudakova, L., Kousal, B., **Kolarova, H.**, Hlavata, L., Liskova, P. (2016) **Genová terapie dědičných onemocnění sítnice a zrakového nervu: Současný stav poznání. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve disorders: Current knowledge.** Čes a Slov Oftal 72 (4), 128-136.*

Supplement 12] ***Kolarova, H.**, Tesarova, M., Svecova, S., Stranecky, V., Pristoupilova, A., Zima, T., Uhrova, J., Volgina, S.Y., Zeman, J., Honzik, T. (2014) **Lipoprotein lipase deficiency: clinical, biochemical and molecular characteristics in three patients with novel mutations in the LPL gene.** Folia Biol 60(5), 235-43. IF 0.778*

Supplement 13] *Ondruskova, N., Honzik, T., **Kolarova, H.**, Pakanova, Z., Mucha, J., Zeman, J., Hansikova, H. **Aberrant ApoC-III glycosylation in glycogen storage diseases Type III and IX.** Metab Clin Exp (submitted).*

Supplement 14] ***Kolarova, H.**, Honzik, T., Zeman, J. (2016) **Dědičné poruchy metabolismu v kazuistikách.** Mladá fronta a. s., Praha, ISBN 978-80-204-4187-4 (first author of 9 chapters: Poruchy cykly močoviny (Urea Cycle Disorders); Fenylketonurie (Phenylketonuria); Glykogenóza typ Ia (Glycogenosis Type Ia); Glykogenóza typ non-Ia (Glycogenosis Type non-Ia); Glykogenóza typ III (Glycogenosis Type III); Lebe-*

rova hereditární optická neuropatie (LHON syndrom; Leber Hereditary Optic Neuropathy); Deficit lysosomální kyselé lipázy (Lysosomal Lipase Deficiency); Deficit lipoproteinové lipázy (Lipoprotein Lipase Deficiency); Hypofosfatázie (Hypophosphatasia); Syndrom MELAS (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes).

1 INTRODUCTION

1.1 Rare diseases

Rare (or orphan) diseases represent a heterogenous group of 8,000 disorders affecting only small number of patients. According to the European Union's Legal Framework, the disease is classified as rare when it affects less than 1 in 2,000. At present, about 80 % of rare diseases have an identified genetic origin, however, they may also be result of an infection or environmental factor. The group consists mainly of developmental anomalies, inborn errors of metabolism and some rare oncology, rheumatic and dermatologic diseases. The list of identified rare diseases can be found in an international database www.orpha.net.

Because of low prevalence, the physicians of the first contact are not often familiar with their manifestation which leads to the diagnostic delay or even misdiagnosis. Another crucial problem of rare diseases is the lack of scientific knowledge causing the absence of appropriate treatment in most cases. Nevertheless, recent advances in therapy are being made, though its high price makes it hardly accessible to the majority of patients. The first gene therapy (Alipogene tiparvovec, Glybera) approved by the European commission for treatment of Lipoprotein Lipase (LPL) deficiency (OMIM 609708) in 2015 may serve as an example. This is efficient, causal treatment, but its cost makes it probably the most expensive drug on the market.

At least 50 % of rare diseases affect children, leading to chronic and life-threatening conditions. Their debilitating character can place heavy burden on patients and their families, who, due to the disease rarity and absence of appropriate healthcare, often feel frustration and loneliness. The efficient management of rare diseases requires concentrated effort of scientists to reveal their underlying pathogenetic mechanisms. Of special importance is the international cooperation in the field of clinical and scientific research (e.g. MetabERN – European Reference Network for Rare Hereditary Metabolic Disorders or ERN-Eye – The European Reference Network on Eye, application 2016), as well as the sharing of scientific knowledge about all rare diseases in approved registries and databases.

Inborn Errors of Metabolism comprise more than 900 disorders and form a large class of orphan diseases most having an incidence of less than 1 in 100,000 births. Although Mitochondrial Disorders (MD) were once considered to be extremely rare, it now appears that mitochondrial dysfunction is amongst the most common causes of inherited human diseases with estimated prevalence at 1: 5,000 [2]. In this thesis, I will particularly focus on MD.

1.2 Mitochondria

Mitochondria are tubular-shaped organelles embedded by an outer membrane that is permeable to most metabolites, and an inner membrane that is selectively permeable, enclosing a matrix within (Figure 1). According to the endosymbiotic theory, the origin of mitochondria lies in the engulfment of aerobic bacterial cell by primitive eubacteria, approx. 2,300 million years ago. This hypothesis would explain their particularity in having their own genome.

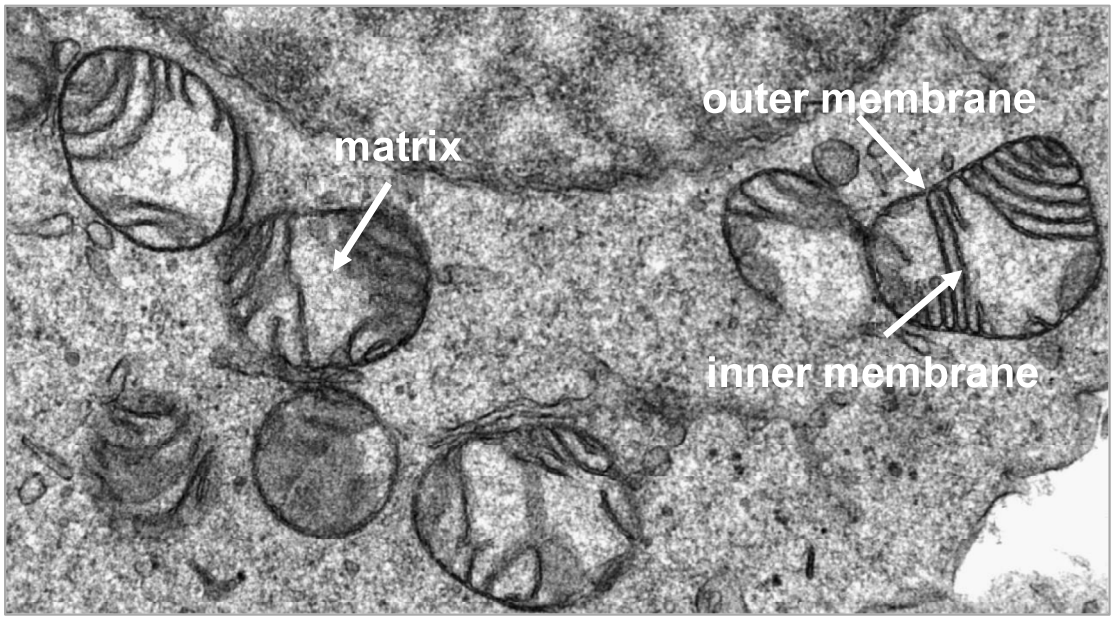


Fig. 1 Mitochondria in Wild type HEK 293 cells. (Transmission electron microscopy, 1400×, JEOL JEM, Peabody, MA; fixation in potassium permanganate; author: Mgr. Marie Rodinová)

1.2.1 Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS)

Mitochondria are responsible for providing the major portion of Adenosine Triphosphate (ATP) for cell energy requirements. This is achieved by Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) organized in four enzymatic Complexes I - IV and ATP synthase that is sometimes referred to as Complex V (Figure 2). Coenzyme Q and cytochrome *c* are also involved in mitochondrial respiration, serving as electron shuttles between the complexes [3]. These, together with various membrane transporters, are concentrated in the inner membrane that is highly convoluted in cristae greatly increasing its effective surface area. In line with the theory of chemi-osmotic coupling, metabolites generated through breakdown of carbohydrates, proteins and fatty acids

are fuelled into the citric acid cycle and subsequently to OXPHOS to generate a proton gradient released through ATP synthase to produce ATP (Figure 3).

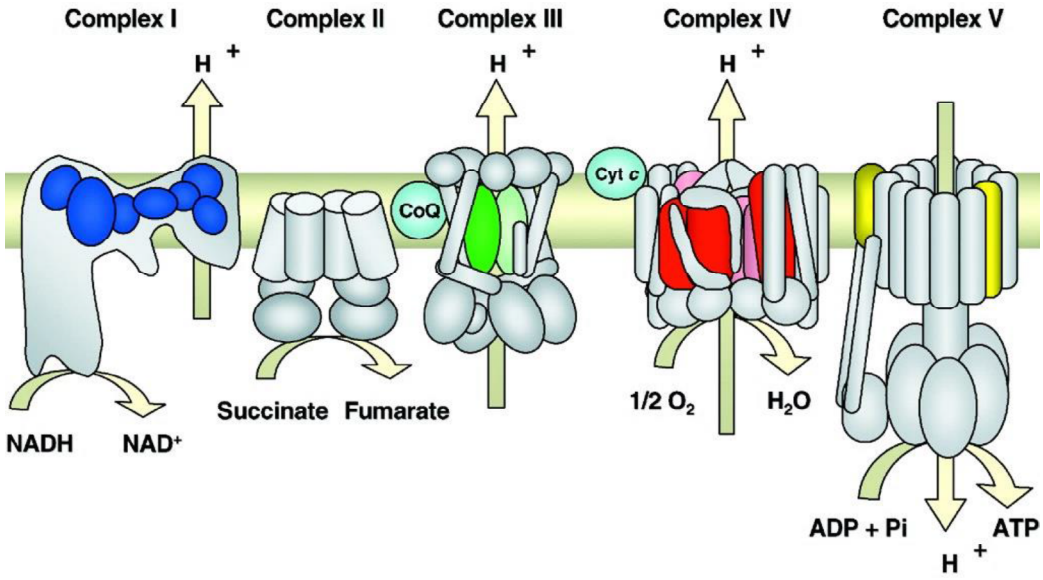


Fig. 2 Schematic representation of OXPHOS [4].

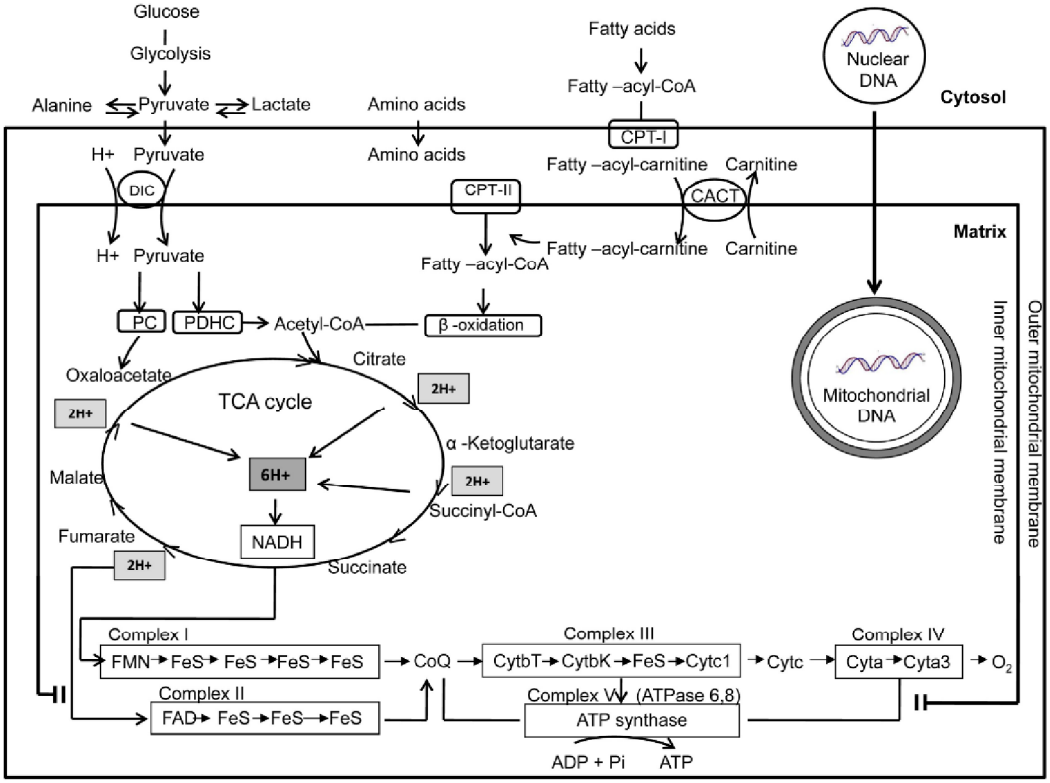


Fig. 3 Metabolic pathways in mitochondrion [5].

Two genomes, the Nuclear DNA (nDNA) and Mitochondrial DNA (mtDNA), control the generation of respiratory chain. All but one complex contains both nDNA and mtDNA-encoded polypeptides (Table 1).

Tab. 1 Proportion of nuclear and mitochondrial DNA-encoded subunits of OXPHOS. Modified from [4, 6-8].

	nuclear-encoded subunits	mtDNA-encoded subunits
Complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase)	37	7 (ND1-ND6, ND4L)
Complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase)	4	0
Complex III (ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase)	10	1 (cytochrome *b*)
Complex IV (cytochrome *c* oxidase)	11	3 (COX I-III)
Complex V (ATP synthase)	13	2 (ATPase 6 and 8)

Complex I (NADH-Ubiquinone Oxidoreductase; NQR) is the entry enzyme of OXPHOS, catalyzing the transfer of electrons from reduced form of Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH; derived by the oxidation of fatty acids, pyruvate and amino acids) to coenzyme Q. It is the largest and the most complicated enzyme of the respiratory chain. Isolated Complex I deficiency is the most frequently observed mitochondrial respiratory chain disorder [9, 10], and is associated with a wide range of clinical presentations, including subacute necrotizing encephalomyelopathy, i.e. Leigh syndrome or Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) [11-13].

Complex II or **Succinate Coenzyme Q Reductase (SQR)** accomplishes the oxidation of Flavin Adenine Dinucleotide ($FADH_2$) derived from fatty acid ß-oxidation and the citric acid cycle. When 1 mol of substrate (e.g. succinate or 3-phosphoglycerate) is oxidized via Complexes II, III and IV, only 1.5 moles of ATP are formed when compared to 2.5 moles of ATP produced by Complexes I, III and IV. Overlooking the apparent SQR inefficacy in net direct capture of ATP, this particular bypassing the first step of OXPHOS may be used in treatment of Complex I deficiencies.

Complex III (Coenzyme Q: Cytochrome *c* Oxidoreductase; QCCR) was among the earliest discovered OXPHOS complexes. It contributes to the electrochemical potential by transmitting electrons from ubiquinol to cytochrome *c* coupled to proton transloncation across the membrane. Mutations in Complex III cause exercise intolerance as well as multisystem disorders.

Complex IV or Cytochrome *c* Oxidase (COX) is a terminal enzyme of the mitochondrial electron transfer chain, coupling the reduction of molecular oxygen with proton electrochemical gradient production [14]. It represents a multicomponent structure with rather complicated biogenesis not only due to its dual genetic origin, but also because of the existence of tissue and age-specific isoforms for certain of its subunits [15-17]. Most isolated COX deficiencies are inherited as autosomal recessive disorders caused by mutations in nuclear-encoded genes [18].

ATP synthase (Complex V) is a large mushroom-shaped asymmetric protein complex using the polarization of the inner membrane generated during the electron transfer. The proton flux through its channel rotates its F_1 portion which results in condensation of ADP and P_i and creation of ATP. Most isolated defects of ATP synthase are associated with alterations in the biosynthesis of the enzyme and can be caused by mutations in subunit genes or in ancillary proteins essential for the enzyme assembly. Since it is a key component in mitochondrial energy conversion, its pronounced defects result in severe conditions manifesting primarily in children, often very shortly after birth [19].

Besides energy production, mitochondria have also important functions in heme and steroid synthesis, calcium homeostasis and apoptosis. In the process of electron transport, mitochondria are a major source of Reactive Oxygen Species (ROS) important in cell signalling. Nevertheless, due to the insufficiency of mtDNA repair system and proximity of respiratory chain and the ROS it generates, mitochondrial genome sustains a significant oxidative damage with a very high mutation rate, 10- to 17-fold higher than that observed in nDNA [20].

Due to its crucial regulatory roles, mitochondrial dysfunction may result in a variety of clinical manifestation of primary MD, and its secondary alterations are nowadays recognized also in various degenerative and metabolic diseases, cancer and aging. The

progressive bioenergetics decline in secondary mitochondrial disturbance is, however, always dependent on combination of several factors, including the initial energetic capacity (nDNA genetic alterations or epigenomic regulation, mtDNA ancient adaptive polymorphisms), acquired accumulation of somatic mtDNA deleterious mutations (exposure to chemicals) and influence of environmental factors (calories restriction, extreme caloric demands) (Figure 4). On the other hand, in most of primary MD, it is the presence of a mutation, i.e. the genetic cause that is crucial for the disease manifestation. Nevertheless, it was not long ago proven for some disorders, e.g. LHON and Dominant Optic Atrophy (DOA) that they also likely have some epigenomic and environmental regulation which modify its phenotypic expression and may be a target for therapeutic intervention. The disease mechanism in both primary and secondary MD is, therefore, likely to be similar and it is only by the proportional participation of the abovementioned factors that the disease is eventually to develop.

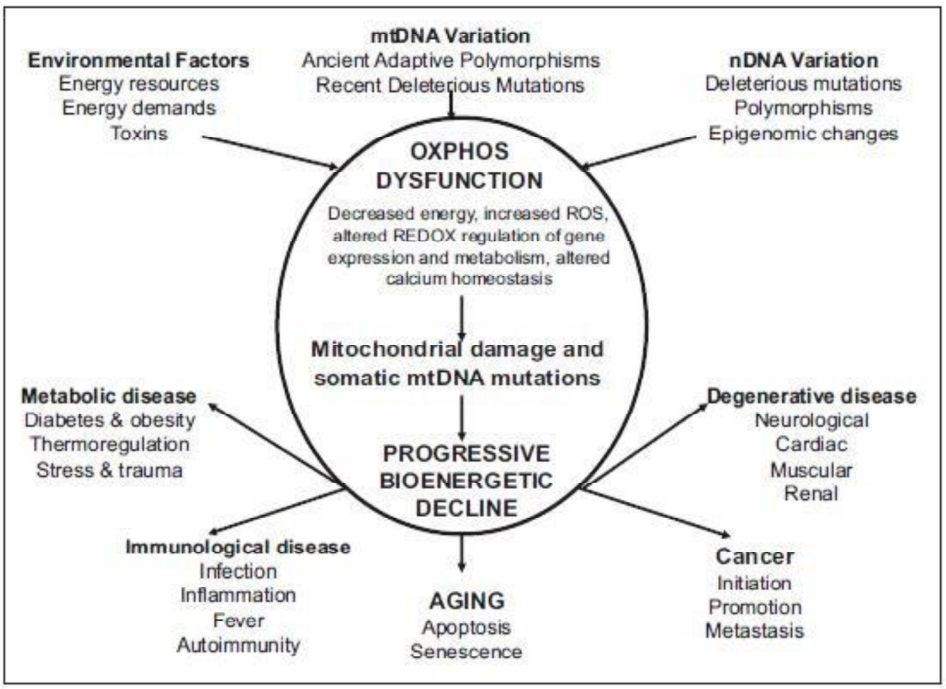


Fig. 4 Bioenergetic paradigm for degenerative and metabolic disease, cancer, and aging [21]. mtDNA, mitochondrial DNA; nDNA, nuclear DNA

1.2.2 Mitochondrial genome

Human mtDNA is a double-stranded circular molecule of 16,569 bp. Each human cell, except mature red blood cells, contains between 100 and 10,000 mitochondria, depending on their energy demand. Since human mitochondria contain two to ten copies of mtDNA, this makes about $10^3 – 10^5$ of mtDNA copies per cell.

Unlike its nDNA counterpart, mtDNA is contiguous with each gene separated by only one or two non-coding bases. The only major non-coding region is represented by the displacement or D-loop with important regulatory functions. Moreover, some genes, such as *MT-ATP6* and *MT-ATP8*, have overlapping regions [1]. Genetic code also differs slightly from nuclear DNA with only two stop codons being used: AGA and AGG, which are standard codons for arginin. Contrarily, standard UGA stop codon is read as tryptophan during mtDNA translation. The linearized structural map of the human mitochondrial genes is shown in Figure 5. The majority of peptides in mitochondria are encoded by nuclear genes with subsequent targeting to mitochondria. MtDNA contains 37 genes encoding for 13 protein subunits of the respiratory chain. Twenty-four genes encode either tRNA (22) or rRNA mature product (16S and 12S subunits) with genes located both on heavy and light strand.

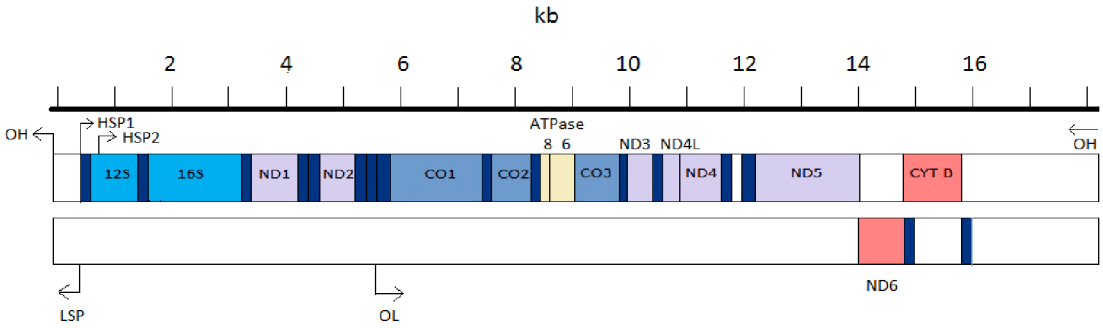


Fig. 5 The linearized structural map of the human mtDNA (modified from [22]). OH, Origin of Heavy Strand Synthesis; OL, Origin of Lagging Strand Synthesis; HSP1,2, Promoters on the Heavy Strand 1,2; LSP, L-strand Promoter

1.2.3 Mitochondrial gene expression and its regulation

MtDNA is transmitted by maternal non-mendelian inheritance due to several reasons: lack of mtDNA copies within sperms when compared to ovum [1], mtDNA bottleneck (will be discussed in Chapter 1.3.1.1) and selective paternal mitochondrial elimination. The latter process was recently proved to be triggered by paternal mtDNA degradation

factor CPS-6, a mitochondrial endonuclease G, whose loss in *C. elegans* led to delayed breakdown of mitochondrial inner membranes, autophagosome enclosure of paternal mitochondria, and, eventually, the delayed paternal mitochondrial elimination itself [23]. Only a single documented case of paternal inheritance [24] should still represent an exception rather than rule.

Unlike nDNA, mtDNA replication is not governed by the cell cycle and is continuously recycled even in non-dividing cells, such as muscle fibres or neurons. MtDNA synthesis begins from two unidirectional origins of replication: Origin of Heavy Strand Synthesis (O_H) and Origin of Lagging Strand Synthesis ($O_{L)}$ and is believed to occur according to the asymmetric model of replication (Figure 6) [25]. MtDNA replication and integrity maintenance is handled entirely by the nDNA with key function of trimeric complex of Polymerase γ (POLG) encoded by *POLG* and *POLG2*, and several additional proteins listed in Table 2. Additionally, adequate supply of mitochondrial (deoxy-) nucleoside triphosphate together with multiple repair mechanisms are necessary for adequate mtDNA replication and their defects may lead to mtDNA deletions or depletions. Replication of the lagging strand is followed by the exposure of the O_L with subsequent lagging strand synthesis in the opposite direction. This model has a direct consequence in delayed completion of the daughter mtDNA molecules with gaps in newly synthesized lagging strand DNA. Although it has been questioned repeatedly (e.g. the symmetric replication mode), new studies provide evidence for only the described orthodox, strand-displacement mode of replication (Figure 6) [26].

Although the prokaryotic origin of mitochondrial RNA polymerase was expected, due to bacterial ancestry of the organelle, human mitochondrial transcription requires bacteriophage-related RNA polymerase in collaboration with the high-mobility-group-box Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM) and two dual-function transcription factors: TFB1M and TFB2M. Contrarily to TFB1M and TFAM, TFB2M seems to be important also for mitochondrial translation [27]. Each strand is transcribed as a polycistronic precursor mRNA molecule. Transcription initiates at one of two Heavy Strand Promoters (HSP1 and HSP2) and a single Lagging Strand Promoter (LSP). Whereas transcripts derived from HSP1 produce mainly two rRNAs, those derived from HSP2 and LSP can be near genome-length polycistronic products with further liberation of smaller transcripts by tRNA processing [25].

Translation machinery is almost entirely under control of nDNA. The mRNA and rRNA is immediately flanked by the tRNA and after the formation of the initiation process with mitochondrial IF 2 and IF3 [28, 29], the peptide elongation by 4 mitochondrial elongation factors Tu, Ts, G1 and G2 is activated. Translation is terminated after the recognition of one of the above mentioned stop codons by mitochondrial release factor 1a [30].

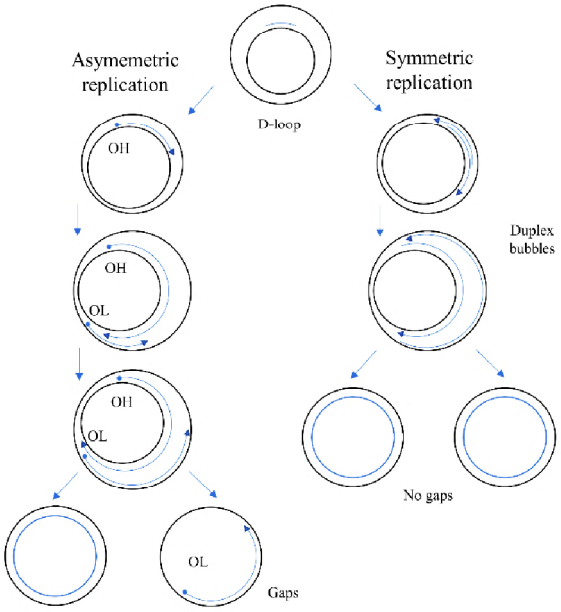


Fig. 6 Asymmetric and symmetric models of mtDNA replication. O_H, Origin of Heavy Strand Synthesis; O_L, Origin of Lagging Strand Synthesis

Tab. 2 Proteins involved in mtDNA replication and integrity maintenance. Modified from [1].

Polymerase γ
Twinkle 5' to 3' DNA helicase
MtSSB
Topoisomerases
MtDNA ligase III
MtDNA primase
RNase MRP, G and H1
TFAM

MtDNA, Mitochondrial DNA; MtSSB, Mitochondrial Single-Stranded Binding Proteins; RNase, RNA Processing Endonucleases; TFAM, Mitochondrial Transcription Factor A

1.3 Mitochondrial biogenesis; liver and muscle development

Biogenesis of mitochondria results both in an increase in the number of mitochondria per cell (i.e. organelle proliferation) and in increase in the functional capabilities of mitochondria (i.e. organelle differentiation) [31]. The dynamics of mitochondrial biogenesis and function is a complex interplay of cellular and molecular processes that ultimately shape bioenergetic capacity [32]. Whereas proliferation of the organelle is a long-term programme controlled at the transcriptional level, differentiation of mitochondria is a short-term programme controlled at the post-transcriptional level, both

by stabilization and translational activation of the transcripts [31]. Mitochondrial biogenesis is triggered by various signals during environmental stresses (e.g. exercise, caloric restriction, oxidative stress, low temperature, cell division, renewal and differentiation). It is tightly regulated through several transcription factors and cofactors that may participate in a hormone-induced signalling pathway. It is especially thyroid hormones, glucocorticoids and oestrogens that regulate the expression of most of the nuclear genes encoding mitochondrial proteins [33-35]. Efficient mitochondrial biogenesis is essential through whole life. Of special importance is its involvement in proper embryonic and foetal development.

1.3.1 Embryonic and foetal metabolism

Mammalian adaptation to the aerobic extrauterine environment involves profound hormonal, physiological and metabolic changes which need to be finely tuned to avoid neonatal morbidity and mortality [36]. There are several stages in foetal development where mitochondrial biogenesis is critical for onward cell or tissue development: the oocyte selection, the placentation and the early postnatal adaptation.

1.3.1.1 The oocyte selection, pre- and post-compaction stages

Mature oocyte contains about 100,000 copies of mtDNA which than segregates rapidly between generations of differentiating cells. Primordial germ cells thus contain only about 10 to 100 mitochondria, originating from oocyte that contributes to the final pool of the offspring, a condition termed as genetic bottleneck (Figure 7). As the oocyte matures, mitochondrial replication restarts with concomitant increase in mtDNA to approx. 100- to 100,000-fold, organized as one per organelle [37]. Although genetic bottleneck was initially thought to represent a selection process against poor-quality oocytes, analysis of distribution of pathogenic mtDNA mutation in the offspring of a carrier mother showed that a risk of inheriting a pathogenic mutation is only increasing with their proportion in the mother but without any bias toward transmitting more or less of the mutant mtDNAs. The load of mtDNA mutation would therefore represent the most important determinant of oocyte quality [38].

In the pre-compaction stage (i.e. 68 hours after fertilization), respiratory rates are very low and the main source of energy comes from an exocoelomic pyruvate and endoge-

nously derived amino acids (i.e. histiotrophic nutrition). On the contrary, glucose uptake is very low and it is therefore poorly metabolised at one-cell stage. With the proceeding compaction and blastocyst development, biosynthetic rates demand glucose as a predominant source of energy with increasing respiratory capacity. Reduced activity of mitochondria in these early stages becomes important when realizing the possible consequences of low oxygen environment during the first trimester, before placenta is vascularised. In such a hypoxic condition, the uncontrolled activity of huge mitochondrial population would lead to an overproduction of ROS or even impose severe hypoxia due to the absence of any oxygen carrier in the exocoelomic fluid.

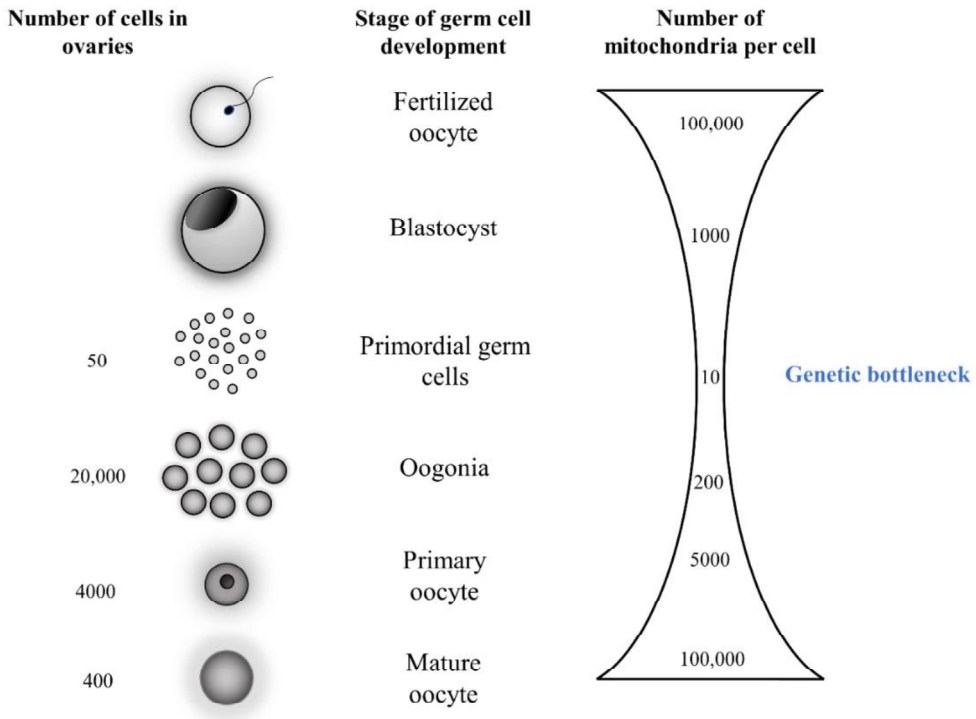


Fig. 7 Schematic representation of changes in the number of mitochondria during development of the female germ line. A genetic bottleneck for the transmission of mtDNA occurs in the primordial germ cells. Adapted from [38].

1.3.1.2 The placentation period

At the end of the first trimester, a threefold intraplacental rise in oxygen has been measured [39, 40]. In mice, this led to considerable morpho-functional changes coinciding with the partial switch from glycolytic to oxidative metabolism. Rapid increase in activity of the electron transport systems and associated phosphorylation processes

after day 10 of rat gestation may have an important role in organogenesis [41]. Similarly, human mitochondria were observed to undergo progressive ultrastructural changes during early embryo development [42].

1.3.1.3 Preparation to early postnatal adaptation

At birth, the full switch from glycolysis to oxidative phosphorylation is of utmost importance for successful adaptation to extra-uterine life in all neonates. Moreover, it was previously shown by our laboratory that activities of several OXPHOS enzymes were significantly lower in immature neonates and suggested that low functional activity of mitochondria is responsible for their high mortality rate due to the delayed mitochondrial biogenesis [43, 44]. Nevertheless, after delivery the adequate capacity of mitochondrial energetic metabolism is critical in all neonates. The cellular competence for ATP provision relies on the adequate biosynthesis of OXPHOS. It is therefore not surprising that neonatal presentation of primary MD is quite common (Table 3).

Tab. 3 Clinical symptoms in 129 neonates with primary MD [45].

Symptom	Prematurity	IUGR	AS	H	HCMP	LS	S	LA*	Died <3 Mo
Proportion of patients	30 %	35 %	69 %	90 %	40 %	15 %	16 %	87 %	26 %

AS, Apneic Spells; HCMP, Hypertrophic Cardiomyopathy; IUGR, Intra-Uterine Growth Retardation; LA, Lactic Acidosis; LS, Leigh Syndrome; Mo, Months; S, Seizures
*Severe, persistent

It is Gestational Week (GW) 22 to 23, that seem to be a limit of foetal viability [46]. Important regulatory changes of mitochondrial function on a genomic level, therefore, need to occur during this period. A profound change of transcription pattern was observed for several OXPHOS subunits within the foetal development [47]. However, this accumulation of transcripts is accomplished rather by increased transcriptional rate than increased half-life of mRNAs as was suggested earlier [31, 48]. On the other hand, it was hypothesized that OXPHOS protein expression in liver is exerted mainly after birth [49]. Similarly, no major differences in respiratory chain enzyme activities were observed throughout the foetal development. Based on these observations, it is probable that prenatal preparation may lean mainly on a transcriptional level spearheading for more flexible post-transcriptional regulation early after birth [49].

Mitochondrial oxidation of fatty acids plays a critical role in energy metabolism after birth [50]. However, only recently it was proven that β-oxidation is active also during foetal life, as it was for long thought that major energy supply comes only from glucose. In the last trimester of intra-uterine life, the fat accumulation becomes more important in human foetus due to its important function in energy storage and temperature maintenance. Some of the deposited fatty acids will accrue from foetal lipogenesis, but the great bulk of foetal lipid is derived from the maternal circulation. This is further supported by an observation in placenta where the activity of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase were inversely correlated with gestational age [50].

1.3.2 Muscle development

Human skeletal muscle is a complex structure, which consists of a variety of fibre types that can be assigned to either of the two main groups (type I and II) according to their metabolic arrangement, myosin isoforms and the type of oxygen carrier. Type I fibres form the so called postural muscles. They have large number of mitochondria and contain myoglobin which imparts its red colour to the muscle. These fibres obtain their energy needs by OXPHOS and although their contraction is slow, duration of muscle shortening may last for hours. On the other hand, Type II fibres, and so the phasic muscles, are capable of fast and intense contraction which can only last within minutes. Their oxidative capacity (and mitochondrial density) is low and primary metabolic fuel is glycogen.

The majority of muscles (limbs and trunk) develop from the embryonic mesoderm of the dermomyotomic part of a somit. After a period of proliferation, between the 7th and 9th GW, primordial muscle cells prolonge and fuse to form bipolar structure called primary myotubes. Secondary myotubes developing on the scaffold of the primary myotubes begin to form since the 10th GW. It has been proposed that secondary myotubes give rise to both type I and II myofibres and primary myotubes only to type I myofibres. Up to about 18 weeks, muscle remains a uniform structure composed mainly of type IIC (IIX). These fibres are presumed to be undifferentiated precursors of both type I and IIA, which are mature, adult fibre types. According to Dubowitz, oxidative fibres of type I start to develop only after the 20th week of gestation, leaving all the previous period to glycolytic type IIC [51]. Since the 28th GW, mature type IIA

fibres start to form and contrarily to adults, they have a bigger size than type I. This disproportion equalizes at about 3rd postnatal month to reach the mature phenotype around puberty. At the time of birth, only 15 – 20 % of fibres remain undifferentiated type IIC.

1.3.3 Liver development, haematopoiesis

Liver is a vital organ with wide range of metabolic functions in adult vertebrates. Nevertheless, in the course of the human foetal development it has another essential role, being the most important reservoir of haematopoiesis. Hepatobiliary system develops in the 3rd to 4th GW and its parenchyma derives from the foregut endoderm. The development of the liver is associated with changes in the vascular system. As follows, hepatic primordium grows into contact with two major venous systems of the foetal circulation: the vitelline veins and the umbillical veins [52]. Vitelline veins soon give rise to sinusoids, and the portal and hepatic veins. Oxygenated blood is brought to the foetus by the two umbilical veins, out of which the right one shortly regresses.

Throughout the embryonic development, haematopoiesis represents a highly dynamic process, taking place in several different localisations. Over the 160 days of foetal growth, haematopoietic production takes place in the yolc sac, subaortic mesoderm (or so-called Aorta-Gonad-Mesonephros Region), liver, spleen, and according to some new reports even placenta, to complete its journey in the bone marrow, which keeps the hemogenic potential till the end of life. Although the origin of haematopoiesis still remains questionable, nowadays it is generally accepted that the haematopoietic stem cells formation occurs in the hemogenic endothelium of the specialized mesoderm of the Aorta-Gonad-Mesonephros Region region (intraembryonic part). The haematopoiesis in the yolc sac (extraembryonic part) would then only give birth to restricted haematopoietic lineages serving for the primary, immediate needs of the embryo.

The assumption that the human embryonic liver rudiment is not able to produce blood cells, but only to host their further proliferation and differentiation, was previously confirmed by the group of Moore [53]. The blood formation in the human liver begins in embryos of about 12 mm in length, i.e. around the 6th GW [54]. Haematopoiesis becomes fully established around the 3rd month of intrauterine life [55, 56]. At approximately 16 weeks' gestation, migratory haematopoietic cells can be observed in the bone marrow which is accompanied by the decrease of their liver production.

1.4 Clinical presentation of MD

MD are a group of clinically, biochemically and genetically heterogeneous diseases with the minimal prevalence estimated as 1 to 5,000 [2]. They may be associated with either OXPHOS dysfunction (due to mutated respiratory complex subunits or their assembly factors) or dysfunction of other mitochondrial processes, including mtDNA integrity maintenance, expression, transport machinery, mitochondrial biogenesis, apoptosis and cofactor biosynthesis. Approximately 67 % of the OXPHOS disorders consist of isolated enzyme deficiency, whereas in 33 % of the cases, multiple enzyme complexes show lowered activities [13]. Due to the existence of two, partially autonomous genetic systems, the identification of mutations in mtDNA or nDNA located genes provides the basis for their current classification. Due to the extreme broadness of the family of MD, whose numbers are growing exponentially, detailed review covering every single of them cannot be made within the scope of this Thesis. Population-based studies suggest that m.3243A>G mutation, responsible for Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes (MELAS, OMIM 540000) syndrome and 3 prevalent mutations m.11778G>A, m3460A>G and 14484T>C causing LHON, are the most common disease-causing mtDNA mutations and they will be discussed in detail in the Thesis.

MD may manifest at any age since birth until late adulthood with either an acute manifestation or chronic progressive disease. Mitochondrial dysfunction can affect any organ of the body; the clinical presentation is, however, the most severe in high energy demanding tissue. The most common MD are described in the article written by Magner, Kolarova *et al.* [57] (Supplement 1). The central nervous system involvement is clinically heterogenous, manifesting as epilepsy, Stroke-like Episodes (SLE) not respecting strict arterial territory limits (Figure 8 A), extrapyramidal abnormalities including Leigh syndrome (Figure 8 B), leukodystrophy (Figure 8 C, D), migraines, bulbar dysfunction, hypophysial abnormalities or cerebellar ataxia (Figure 8 F, G), often accompanied by developmental delay (Figure 8 E, F, G). Similarly, the great majority of patients with MD have some degree of hearing or vision impairment with broad variety of ophthalmologic findings ranging from ophthalmoplegia with ptosis (Figure 9 A) to retinal (Figure 9 B), macular or optic nerve dysfunctions. Although mitochondriopathies were long regarded as disorders affecting only the peripheral and

central nervous system (i.e. encephalomyopathies), it is now known that they can have many visceral complications affecting heart (Figure 9 C), gastrointestinal (Figure 9 D), renal or endocrinological system and blood composition. About 10 % of patients with primary MD present with skin involvement that can be categorized into hair abnormalities (Figure 9 E), palmoplantar keratoderma (Figure 9 F), multiple symmetric lipomatosis, rashes, pigmentation abnormalities and acrocyanosis. It is also believed that mitochondrial pathology contributes to the pathophysiological processes of both common and rare skin diseases [58]. Some MD affect only a single organ (e.g. the optic nerve in LHON), but many involve multiple organ system characteristically clustered in specific syndromes, such as MELAS, Kearns-Sayre syndrome (KSS, OMIM 530000), Chronic Progressive External Ophthalmoplegia (CPEO), Myoclonic Epilepsy associated with Ragged red fibres (MERRF, OMIM 545000) and Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa (NARP, OMIM 551500). However, there is a considerable clinical variability and many affected individuals do not fit into one particular category or manifest with overlapping features of several MD.

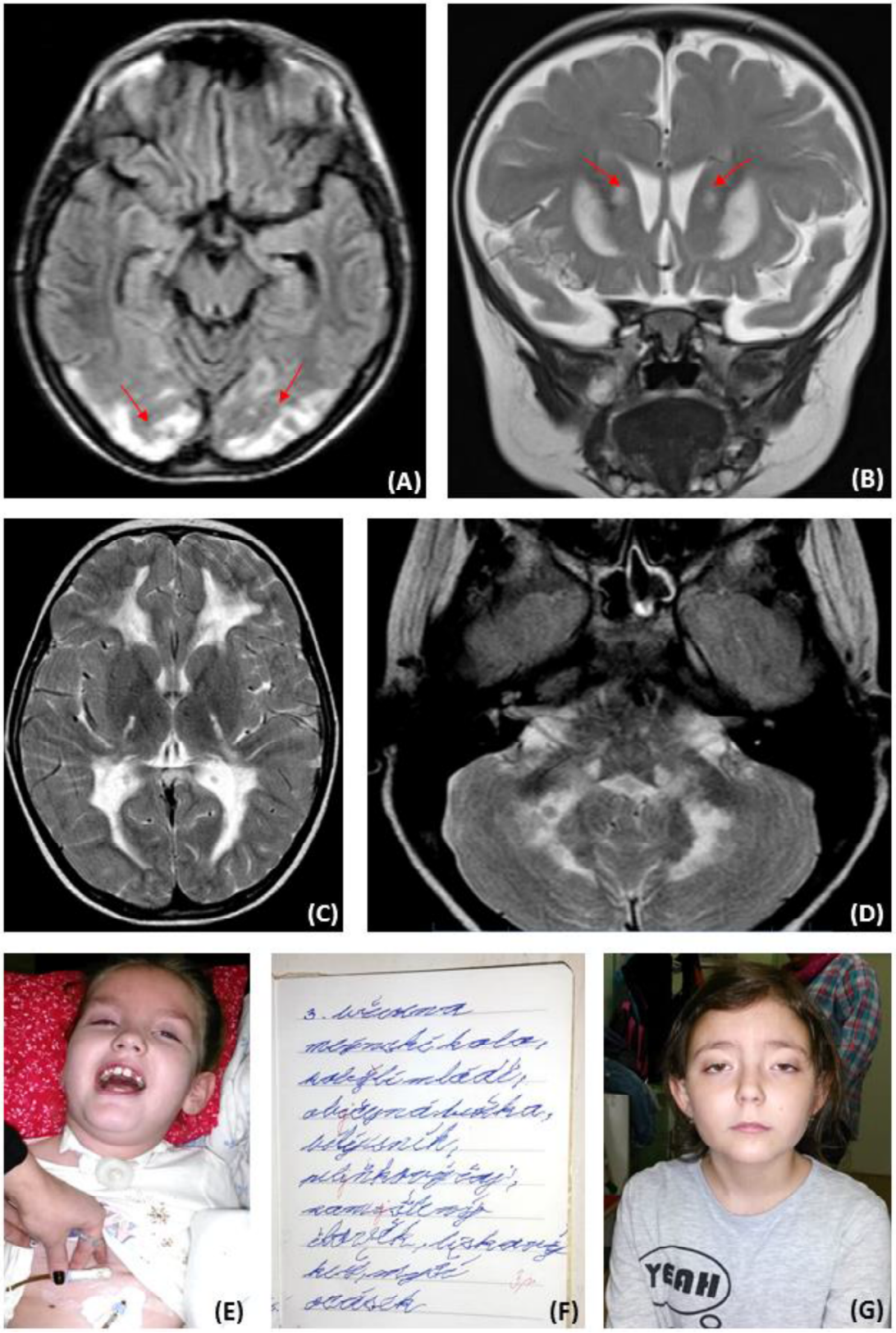


Fig. 8 Head MRI (FLAIR) of a 16-year-old MELAS patient illustrating bilateral occipital hyperintensity indicative of stroke-like episodes **(A).** Head MRI scan (T2-weighed images, T2W) of a 8-month-old patient with NDUFS8 deficiency showing Leigh encephalopathy **(B).** Head MRI (T2W) scan of a girl with leukodystrophy based on Leukoencephalopathy with Brain Stem and Spinal Cord involvoment and Lactate elevation **(C, D**). A 5-year-old girl with SURF1 deficiency presenting as severe developmental delay and extreme muscle weakness that made her dependent on endotracheal tube and gastrostomy **(E).** An 11-year-old girl with ataxia and bilateral ptosis based on Kearns-Sayre syndrom **(F, G).** Assoc. Prof. Honzik's medical records files. Photographs were taken after obtaining an informed consent from patients or their legal representative.

Fig. 9 Ptosis and progressive external ophthalmoplegia in 35-year-old woman with Kearns-Sayre syndrom **(A).** Retinitis pigmentosa of a 15-year-old girl with Mitochondrial Encephalopathy with Stroke-Like Episodes **(B).** Roentgenogram of the chest of a 10-year-old patient with heteroplasmic mutation m.8363G>A and the evidence of a cardiomegaly **(C).** Extreme cachexia in two brothers aged 26 (left) and 22 (right), respectively, suffering from Mitochondrial Neurogastointestinal Encephalopathy **(D).** Their BMI is 8 and 11, respectively. Hypertrichosis of the forearm and the back of 18-month-old and 2.5-year-old patient, respectively, both suffering from SURF1 deficiency **(E, F).** Plantar keratoderma in 14-year-old girl with maternally inherited deafness **(G).** Assoc. Prof. Honzik's medical records files. Photographs were taken after obtaining an informed consent from patients or their legal representative.

1.4.1 Diagnostics of MD

Diagnostics of MD is demanding as virtually any symptom may be a part of its clinical spectra. Its investigation requires an integrated approach: clinical (including the personal and family history), biochemical, histological and genetic. MD have highly variable age of onset and disease course that may involve structural and functional impairment of any organ or tissue depicted in Figure 10. Specialized examination, especially echocardiogram and Electrocardiogram (ECG), Electromyography (EMG), ophthalmic examination, audiology testing and brain imaging, can help us characterize systemic involvements and should be performed, depending on the patient's specific condition and needs. Basic chemistries of blood and urine, together with complete blood count provide very efficient and supporting evidence for clinical examination [59, 60]. Elevation in lactate and pyruvate concentration in both blood and Cerebrospinal Fluid (CSF) can be observed in some [61], but not all patients with MD: patients with Leigh syndrome usually present with elevated lactate in both blood and CSF, but in MELAS it does not seem to be a permanent finding and patients with LHON almost never have an elevation of lactate. The gold standard of diagnostics includes specialized biochemical analyses, including spectrophotometric analyses of OXPHOS activities, high resolution respirometry [62, 63], substrate oxidation, evaluation of mtDNA copy number by real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) and histological and histochemical examination of muscle, skin or other tissue samples (Figure 11, 12). Although with the large-scale assessment of entire mitochondrial genome, Next-Generation Sequencing (NGS) can revolutionize diagnostics of MD, the role of clinical consideration is still of utmost importance. A great proportion of MD present with a characteristic combination of clinical and laboratory findings (Table 4) which allows selecting genes for targeted molecular genetic testing even without invasive muscle or skin biopsies. According to our experience (and supported by several of our articles), characteristic combination of symptoms and laboratory data could help us to sort out patients with characteristic disorders without any need of expensive and time-consuming NGS. It is of note that despite these advances, many cases still do not receive a specific diagnosis.

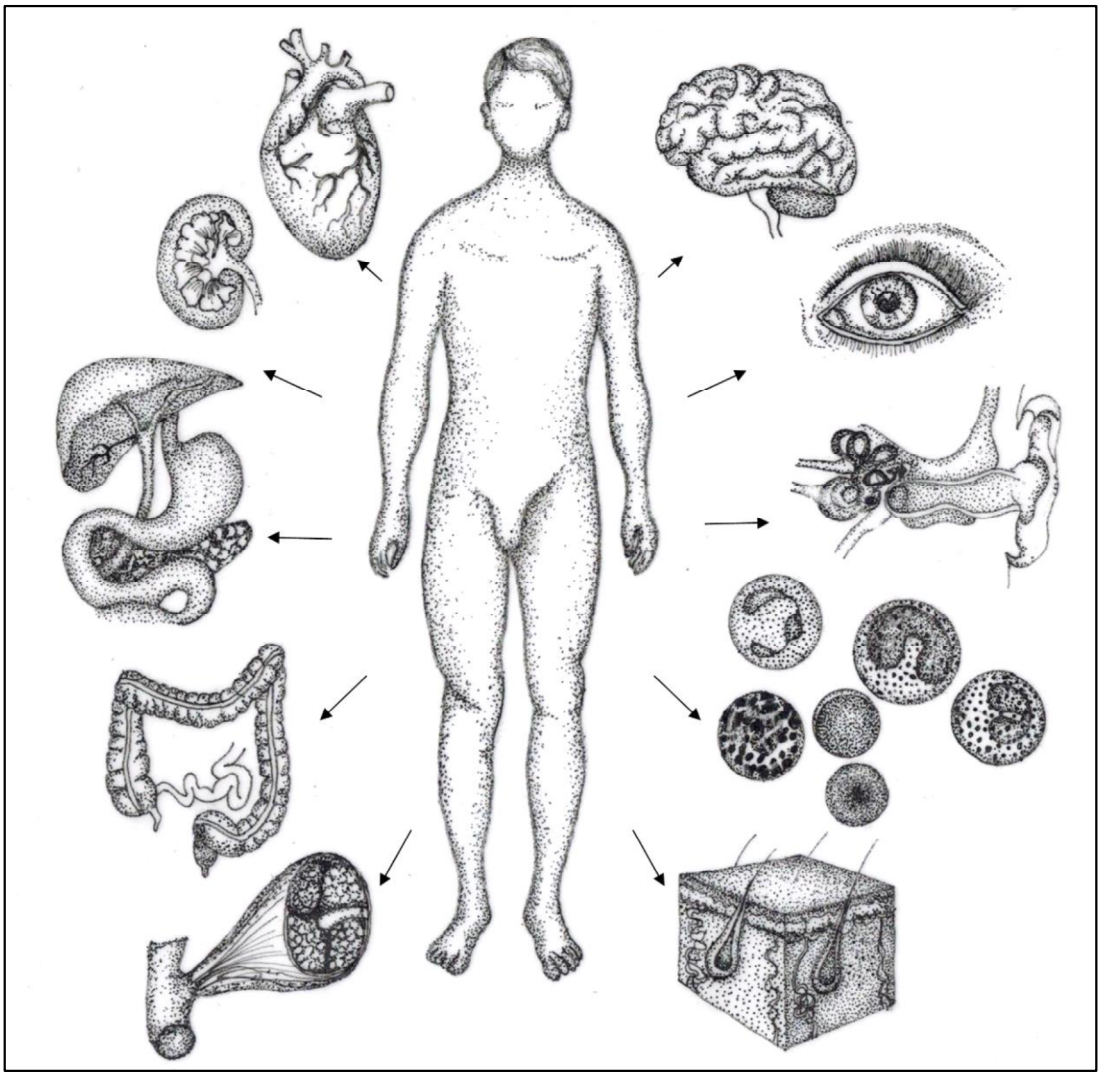


Fig. 10 Schematic representation of multisystemic presentation in mitochondrial disorders.
(author: Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.)

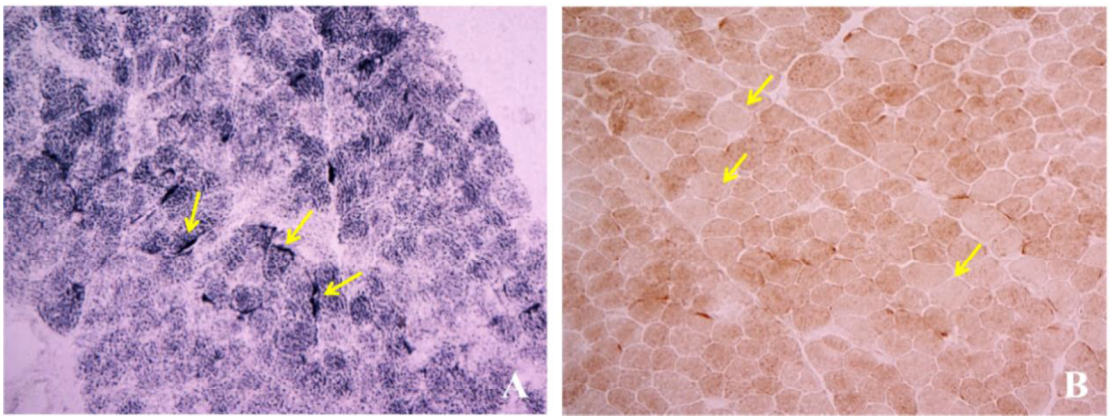


Fig. 11 Histology of muscle biopsy of a 1.5-month-old girl with AARS2 deficiency. Although the presence of typical ragged red fibres was not observed in skeletal muscle histochemistry, the severity of the subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase product (marked by arrows) in a proportion of muscle fibres was profound for this age (succinate dehydrogenase histochemistry, original magnification 400×) **(A).** In cytochrome *c* oxidase histochemistry in the skeletal muscle, the reaction was weak in a portion of fibres, but no completely cytochrome *c* oxidase negative fibres were found (cytochrome *c* oxidase histochemistry, original magnification 200×, indicated by arrows) **(B).**

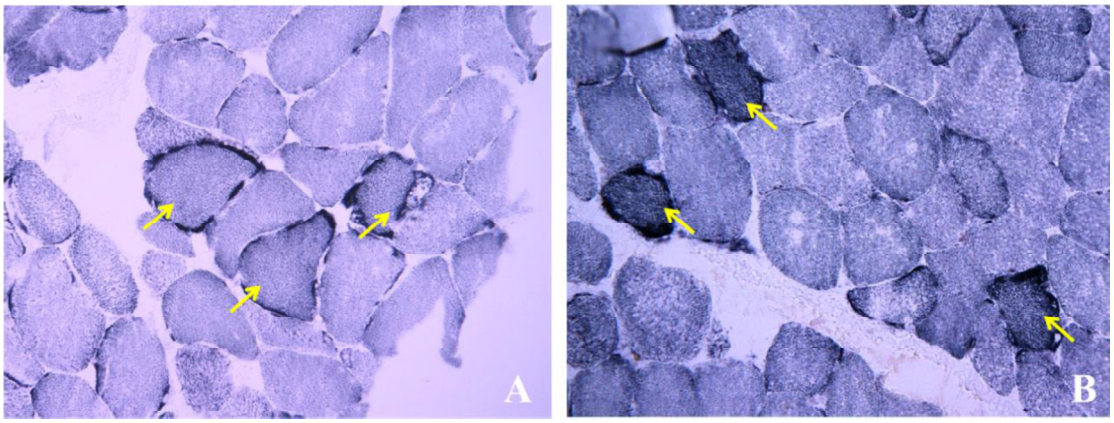


Fig. 12 Histology of muscle biopsy of a 45-year-old woman with Kearns-Sayre syndrome. Arrows indicate typical appearance of ragged red fibres (succinate dehydrogenase histochemistry, original magnification 400×) (**A, B**).

Tab. 4 Combination of clinical features and laboratory parameters in selected MD enabling direct molecular genetic testing without invasive muscle biopsy. Based on our experience, Laboratory for Study of Mitochondrial Disorder in Prague, Czech Republic.

Key symptom	Primary symptom/s	Associated symptoms	Laboratory parameters	Mitochondrial disorder
Leigh syndrome	Retinitis pigmentosa	Neuropathic muscle weakness, ataxia, regression of PM development	LA	MILS/NARP syndrome [64]
Leigh syndrome	Ataxia	Polyneuropathy	LA, hyperammonemia	m.8851T>C in *MT-ATP6* [65, 66]
Leigh syndrome	Early infantile onset, failure of PM development	Hypotonia, polyneuropathy, West syndrome	LA	m.10158T>C in *MT-ND3**
Leigh syndrome	Cardiomyopathy	Acute Stroke-like encephalopathy, polyneuropathy, epilepsy	LA	m.8363G>A in *MT-TK* [67]
Leigh syndrome	Polyneuropathy	Growth failure, hypertrichosis, very slow cognitive decline	LA, ↓ COX activity[&]	SURF1 deficiency [68]
Leigh syndrome	Ventriculomegaly, a/dysgenesis of corpus callosum	Epilepsy, failure of PM development	LA, ↓ lactate/pyruvate ratio, ↓ PDH complex activity[&]	PDHA1 deficiency [61][Ω]
Leigh syndrome	Myopathy, cardiomypathy	PM delay/intellectual disability, epilepsy	MMA, LA, hepatopathy, mtDNA depletion	SUCLG1 and SUCLA2 deficiency [45]
Cardiomyopathy	Neonatal onset, persistent newborn pulmonary hypertension, hypospadia in boys	Growth failure, hypotonia, PM delay	LA, 3-MGA, hyperammonemia	TMEM70 deficiency [60, 69]
Cardiomyopathy	Inspiratory stridor	SMA-like phenotype, Leigh syndrome	LA	SCO2/SCO1 deficiency [68, 70, 71]
Cardiomyopathy (mainly dilated) in boys	Growth failure	Myopathy	Neutropenia, 3-MGA	Barth syndrome [59]
Cardiomyopathy	Neonatal onset, respiratory distress, hypotonia	Myopathy	LA	AARS2 deficiency[13]
Stroke-like episodes	Migraines, hearing loss	Ptosis/CPEO, myopathy, diabetes mellitus, psychiatric disturbances	LA	MELAS syndrome [72, 73]
Optic atrophy	Sudden, painless visual loss	*Plus* phenotype-Myopathy, hearing impairment, polyneuropathy	NR/hyperalaninemia	LHON syndrome [74]
Optic atrophy	Autosomal dominant visual impairment	*Plus* phenotype-movement disorder, polyneuropathy, brain white matter abnormalities, hearing impairment	NR/hyperalaninemia	OPA1 deficiency [75]

Ptosis/CPEO	Cardiomyopathy, atrioventricular block, retinitis pigmentosa	Ataxia, myopathy, tubular and/or glomerular dysfunction	↑ CSF-protein	Kearns-Sayre syndrome[£]
Hearing loss	Maternal inheritance, aminoglycoside-induced in some patients	Palmar and plantar keratoderma	NR	Maternally inherited non-syndromic hearing loss
Myoclonic epilepsy	Myopathy, hearing impairment	Intracerebral calcification, ataxia	LA	MERRF syndrome [76]
Myoclonic epilepsy, epilepsia partialis continua	Poliodystrophy, regression of PM development	Ataxia	↑ CSF-protein, valproic acid-induced liver failure, hepatopathy	Alpers syndrome (POLG deficiency)
Leukoencephalopathy	Movement disorder, progressive ataxia	Epilepsy, very slow cognitive decline	↑ CSF-lactate	LBSL (DARS2 deficiency)
Leukoencephalopathy	Gastrointestinal dysmotility with pseudo-obstruction, kachexia	Ptosis/CPEO, polyneuropathy, myopathy	LA	MNGIE syndrome (TP deficiency) [77]
Destructive myopathy	Cardiomyopathy	Regression of PM development	LA, ↑↑ muscle enzymes, mtDNA depletion	TK2 deficiency [78][€]
Red blood cells-dependent anemia	Growth failure, hypotonia	PM delay	Sideroblastic anemia, pancreatic insufficiency	Pearson syndrome
Red blood cells-dependent anemia	Myopathy, cardiomyopathy	Growth failure, hearing impairment, intellectual disability	Sideroblastic anemia, LA	MLASA syndromes[¥] and COX10 deficiency

AARS2, mitochondrial alanyl-tRNA synthetase; COX, cytochrome *c* oxidase; CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; CSF, cerebrospinal fluid; DARS, aspartyl-tRNA synthetase 2; LA, Lactic acidosis; LBSL, Leucoencephalopathy with Brainstem and Spinal cord involvement and lactate elevation; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; MELAS, Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy; Lactic Acidosis, Stroke-like episodes; MERRF, Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers; MILS/NARP, Maternally Inherited Leigh Syndrome/Neuropathy, Ataxia and Retinitis Pigmentosa; MLASA, Myopathy, Lactic Acidosis, Sideroblastic Anemia; MMA, methylmalonic aciduria; MNGIE, Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy; MTATP6, mitochondrial ATP6 subunit-complex V; mtDNA, mitochondrial DNA; MTND3, mitochondrial ND3 subunit – complex I; NR, not relevant; PDH, pyruvate dehydrogenase (PDH); PDHA1, pyruvate dehydrogenase complex, subunit E1alpha, X-linked; PM, psychomotor; POLG, polymerase gamma; SUCLG, succinate-CoA ligase alpha subunit; SMA, spinal muscular atrophy; TK, thymidine kinase; TP, thymidine phosphorylase; 3-MGA, 3-methylglutaconic aciduria

*at presentation clinically undistinguishable from MILS syndrome caused by m.8993T>G in *MTATP6*

[&]measured in lymphocytes

[Ω]↑ branched-chain amino acids in plasma in PDH deficiency caused by DLD subunit deficiency (dihydrolipoamid dehydrogenase)

[£]clinical phenotype of Kearns-Sayre syndrome (sporadic mitochondrial DNA large scale single deletion) was redefined into isolated CPEO, CPEO plus, Kearns-Sayre spectrum and classical Kearns-Sayre syndrome. Pearson syndrome is defined separately due to its specific clinical features

[€] apart from myopathic/cardiomyopathic form of TK2 deficiency, other less frequent symptoms have been described including neurological features such as epilepsy, spinal muscular atrophy like manifestation, proximal muscle weakness, CPEO or senzorineural hearing loss and hepatic involvement.

[¥]PUS1 (pseudouridine synthase) and YARS2 (tyrosyl-tRNA synthetase) deficiency

1.4.2 MELAS syndrome

MELAS syndrome is a characteristic example of a devastating multisystemic mitochondrial disorder. By far the most common (>80 %) pathogenic variant associated with the disease is the m.3243A>G transition in *MT-TL1*, followed by m.13513G>A and m.3271 T>C. The clinical variability and age of onset is broad, ranging from severe neonatal or infantile manifestations [45, 79, 80] to milder, adult-onset forms [81]. The severity of the disease was reported to be depending on the level of mutated DNA (i.e. heteroplasmy) in affected tissues [82]. Originally reported cases presented primarily with exercise intolerance, seizures and sensorineural hearing loss. It is also the most common etiology of strokes in childhood; together with another rare metabolic disorder, homocystinuria, MELAS accounts for 25 % of strokes in children aged 1 month – 13 years, followed by heart diseases and coagulopathies, which both make up for 17 % [83]. Noteworthy, in MELAS patients, the highest proportion of mutated mtDNA was observed in the walls of the leptomeningeal and cortical blood vessels, supporting the hypothesis of vascular mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of strokes or SLE [84]. Many other clinical features were later added to the list of clinical manifestations, including cardiomyopathy, migraines, gastrointestinal and endocrinological involvement and in some reports the proportion of patients meeting diagnostic criteria for MELAS goes down to about 10 % of patients [85]. Instead, many of the mutation carriers often present with incomplete forms and may even remain asymptomatic. The “MELAS” acronym in a classical way may, therefore, lead to misdiagnosis if clinicians considered it only in terms of a complete syndrome. Similarly, some of the symptoms are coupled within nosographic terms, i.e. Maternally-Inherited Diabetes and Deafness (MIDD). Although hearing loss and diabetes are associated with a high statistical significance, pure MIDD seems to be quite rare and its prognostic value is questionable since patients may be even more prone to the development of multisystem complications [84].

Ocular involvement, along with myopathy and encephalopathy, figures prominently in the phenotypic spectrum of not only MELAS but the majority of MD and includes several neuroophthalmic manifestations ranging from CPEO with ptosis to retinal, macular or optic nerve dysfunctions.

1.5 Optic neuropathies

The term optic neuropathy refers to damage to the optic nerve anywhere between the Retinal Ganglion Cells (RGC) and the lateral geniculate body. The analogously used term "Optic atrophy" is actually a misnomer referring to final involution, resulting from prolonged disease. The classic clinical signs of optic neuropathy are visual field defect, dyschromatopsia, and abnormal pupillary response. Anything that can compromise RGC or its axon function can cause optic atrophy. This may be due to acquired reasons (ischaemia, compression, infiltration, trauma, intoxication or nutritional deficiency). Despite the contrasting etiology, they may all lead to chronic visual impairment or even registrable blindness that has a significant detrimental impact on the overall quality of life.

Mitochondria play a central role in maintaining the life cycle of high-energy dependent RGC and their dysfunction is one of the most common causes of inherited optic neuropathies. It may be either due to inherited or acquired causes. Vitamin B_{12} or folic acid deficiency both lead to a progressive bilateral optic neuropathy caused by alterations of mitochondrial metabolism [86, 87]. Similarly, as some of the antibiotics or antituberculotics (aminoglycosides, tetracyclines, chloramphenicol or ethambutol) interfere with mitochondrial ribosomal machinery, their use in patients with Mitochondrial Optic Neuropathy (MON) is warranted [88-90].

1.5.1 Inherited optic neuropathies, MON

The two major prototypes of inherited optic neuropathies are maternally inherited LHON and DOA, in 64 % of cases caused by heterozygous mutations in nuclear-encoded *OPA1* gene [91]. These two classical disorders share the same etiology of primary mitochondrial dysfunction and will be the main focus of the following part of the Thesis. Optical neuropathy can also develop in other classical mitochondrial syndromes, e.g. MERRF, CPEO, KSS, NARP and Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy (MNGIE, OMIM 603041, 131222, 612075, 551500 or 613662) [92]. Although MELAS is usually associated with retrochiasmal visual loss due to experienced SLE in occipital and/or parietal lobes [93], it may less commonly present with optic neuropathy as pure MELAS or an overlap phenotype with other MD [94].

As the genetic basis of other inherited optic neuropathies were uncovered, it became apparent that mitochondrial dysfunction is a recurrent theme underlying the loss of RGC in these disorders [95]. The mitochondrial network is regulated in highly sophisticated ways. Mitochondrial fission is facilitated by Dynamin-like Protein 1 [96], while Mitofusin 1 and 2 on the mitochondrial outer membrane, and OPA1 on the mitochondrial inner membrane are essential for mitochondrial fusion [97]. *MFN2* mutations are responsible for specific subtype of Hereditary motor and sensory neuropathy type VI which besides severe peripheral neuropathy manifests with optic nerve dysfunction [98, 99].

1.5.2 Disease mechanisms of LHON a DOA

Despite their contrasting genetic bases, both LHON and DOA share remarkable pathological similarities marked by selective loss of RGC, the ultimate neurons located near the inner surface of the retina. Their axons cross *lamina cribrosa* (Figure 13 A), become myelinated and eventually form the optic nerve. It seems that energy demand of each nerve fibre is a function of its length, circumference and number of Ranvier's nodes [100]. Histochemical studies have demonstrated dramatic mitochondrial clustering in areas anterior to the *lamina cribrosa*, where the unmyelinated optic fibers are leaving retina to form the optic nerve [101]. This very portion relies on high energy-requiring sodium-potassium ATPase which may partly explain its particular vulnerability [102]. Mitochondrial dysfunction results in local stasis of axoplasma with swelling and subsequent degeneration of RGC layer and the optic nerve atrophy [103]. This susceptibility to energetic failure at the level of lamina cribrosa is believed to be common to both LHON and DOA pathogenesis. Moreover, similar pattern of central, caecocentral or paracentral scotomas with dyschromatopsy matches the early and preferential vulnerability of the small axons in the papillomacular bundle (Figure 13 B), which is the anatomical substrate for visual acuity and colour vision [104].

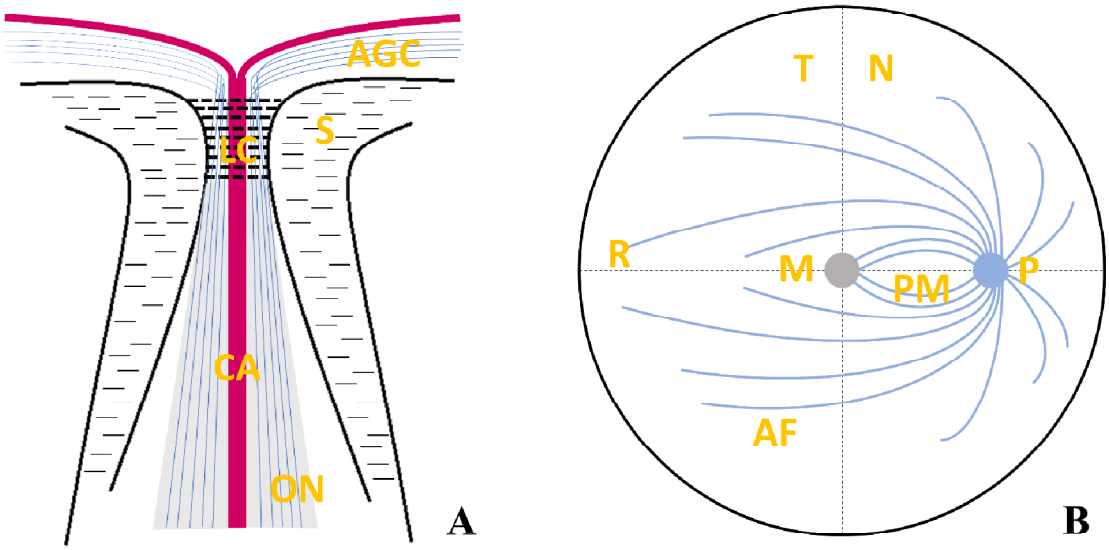


Fig. 13 Cross-sectional view of the optic nerve head (A). For simplification, only the central retinal artery is shown. Retinal ganglion cell axons arising in the nerve fiber layer course in bundles within the optic nerve, separated by glia. The lamina cribrosa is contiguous to the sclera. Adapted from [105]. **In the retina, the axons of retinal ganglion cells are arranged in three basic patterns (B)**: the papillomacular bundle from the macula the superior and inferior arcuate fibres from the temporal retina, and radial bundles from the nasal retina. Adapted from [105]. AGC, Axons of Retinal Ganglion Cells; AF, Arcuate Fibres; CA, Central Retinal Artery; LC, Lamina Cribrosa; M, Macula; N, Nasal Retina; ON, Optic Nerve; P, Papilla; PM, Papillomacular Bundle; R, Radial Bundles; S, Sclera; T, Temporal Retina

1.5.3 LHON

Leber hereditary optic neuropahy (LHON, OMIM 535000) is the most frequent MD affecting about 1/10,000 of the population [95].

1.5.3.1 Etiology

Three pathogenic homoplasmic point mutations of mtDNA at positions 11778/*MT-ND4*, 3460/*MT-ND1* and 14484/*MT-ND6* in Complex I are agreed to be causative for the majority (>90 %) of sporadic and familial cases [101]. These mutations consistently decrease the Complex I specific activity in various tissues or interfere with proton translocation and Complex I-dependent energy conversion [74, 101, 106]. Since Complex I produces approximately 40 % of the proton-motive force and is considered the major mitochondrial source of ROS [107], this leads not only to reduced ATP synthesis (most pronounced in m.11778G>A, followed by m.14484T>C and m.3460G>A which corresponds also to the severity of clinical manifestation), but also to increased oxidative stress [101, 108].

Mutation in *MT-ND1*, *MT-ND4* and *MT-ND6* are necessary but not sufficient to cause blindness. Moreover, considerable variability in visual dysfunction and disease progression may also be seen among family members, all of whom share the same mutation [101]. Development of visual failure is nowadays believed to be a result of several risk factors depicted in Figure 14. Since ROS are not only the toxic byproducts but also a signalling system for triggering apoptosis [109], other environmental factors (e.g. smoking and heavy alcohol consumption) may be responsible for shifting the tightly regulated balance towards cell death in LHON [110]. On the other hand, the female hormones oestrogens are known to have some compensatory effect on cells affected by LHON which is achieved through several mechanisms: the activation of the antioxidant enzyme superoxide dismutase 2, activation of mitochondrial biogenesis and small, but significant improvement in energetic competence [111]. These findings not only strongly support the unexplained LHON prevalence in men (see below) but also hold premises for potential therapeutic involvement of oestrogen receptor β localized to RGC [111]. More detailed decription of LHON pathogenesis can be found in the article of Kolarova *et al.* [112] (Supplement 10).

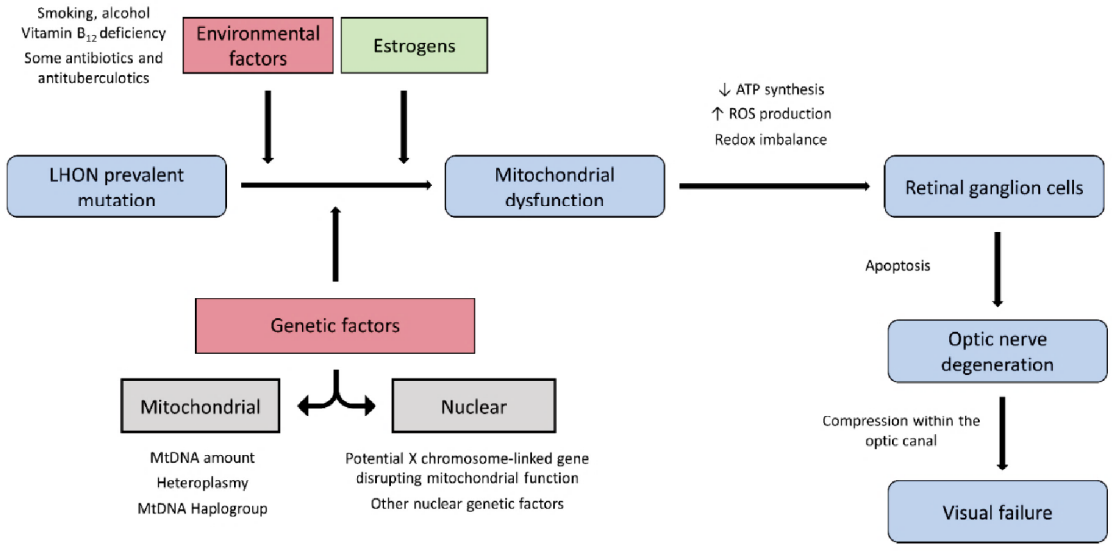


Fig. 14 Schematic representation of the pathways leading to optic nerve degeneration in LHON [59, 113]. LHON, Leber Hereditary Optic Neuropathy; mtDNA, mitochondrial DNA; ROS, Reactive Oxygen Species

1.5.3.2 Clinical presentation

LHON is characterized by progressive painless visual deterioration, usually resulting in irreversible blindness. In the vast majority of cases, visual loss becomes binocular,

with involvement of the fellow eye either simultaneously or sequentially within 6 – 8 weeks. The disease is typical with its age- and gender-related penetrance, although neither of those may fully predict the individuals in risk of the disease manifestation. The peak age of onset is between 18 - 35 years (median onset at 24 years); nevertheless, cases presenting at the age of 1 to 70 years have been described [114, 115]. Only about 50 % of male and 10 % of female mutation carriers become affected [116]. In LHON, visual fields may sometimes (4 - 50 %, depending on type of mutation) show reduction in size of the scotoma or its fenestration, both leading to an improvement in visual acuity [116, 117].

In acute and subacute stages of visual deterioration in LHON patients, there are some observable changes on ophthalmic and neurooophthalmic examination. Visual Evoked Potentials (VEP) examination and Electroretinography (ERG) may show reduced amplitudes and prolonged peak latencies of cortical responses [18]. Fundus findings often include circumpapillary teleangiectatic microangiopathy and elevation of the Retinal Nerve Fiber Layer (RNFL) around the optic discs which can by objectified by Spectral-Domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT). This feature is decribed as pseudooedema since there is no dye leak on fluorescein angiography which has been the gold standard to evaluate retinal circulation in LHON patients [118-120]. A novel technique providing high-resolution images of retinal and peripapillary capillaries by non-invasive visualization of vascular flow via motion contrast appeared recently [121]. Besides higher resolution, SD-OCT-Angiography (SD-OCT-A) can objectify vascular structures in an arbitrarily selected depth of retinal layers without the need to administer a contrast agent [122].

It is of importance that the above mentioned acute findings, along with other features, were observed in presymptomatic or asymptomatic mutation carriers who never loose vision in their lifetime [114, 123]. In turn, significantly prolonged peak latencies on VEP were observed in a group of 48 asymptomatic m.11778G>A mutation carries who never experienced visual loss [124]. Indeed, having abnormalities of either ophthalmic or specialized neurophysiologic testing does not necessarily signify the forthcoming visual loss. Contrarily, some patients with LHON never exhibit characteristic ophthalmoscopic appearance, even examined at the time of acute visual loss. By all accounts, structural changes do not correlate with clinical phenotype and predictive value of these, often discrete findings in LHON, still remains unknown.

Within the chronic phase, The RNFL gradually degenerates and after at least twelve months optic atrophy is a universal feature of LHON. The majority of patients develops large central or caekocentral scotomas corresponding to severe visual deterioration with visual acuity ≤0.1 according to WHO (corresponding to 3/60 – 1/60 or 0.05 – 0.02 on Snellen charts and 1.0 logMAR) or blindness (≤1/60 or 0.02 on Snellen chartsand 1.3 log-MAR).

1.5.3.3. Extraocular presentation and LHON plus

Generally, eye is the only affected organ in LHON but a small subgroup of patients will develop additional extraocular features, such as sensorineural hearing loss, peripheral neuropathy, non-specific myopathy, myoclonus, tremor and cardiac conduction defects [125-127]. Additional neurological signs were thought to be found only in patients with symptoms of optic neuropathy, although there are currently at least two exceptions in the literature [128-130]. It is of interest that mild neurological complications were already recognized by Theodor Leber in his original paper from 1971 after whom the disorder was named [126].

In 1995, Newman et al. used a term Leber *plus* (or elsewhere LHON *plus*) to describe patients with the clinical features of LHON in addition to other severe neurological or systemic abnormities [131]. Originally, it was considered that LHON *plus* is associated only with rarer pathogenic mtDNA variants in isolated pedigrees from Holland, Australia and North America that differ from the three commonly seen in LHON [126, 132-135]. However, LHON complicated by spastic dystonia has been reported in at least two m.11778G>A and in one m.3460G>A family [128, 136]. Moreover, several recently described point mutations with pronounced inhibitory effect on Complex I activity have also been identified in patients with overlapping symptoms of LHON and MELAS [94, 137, 138], LHON/Leigh syndrome [139] or MELAS/Leigh syndrome [140] and it was further proposed the mechanism of microangiopathy contributes to the development of vision loss in these MD [101].

In other cases, functional role for the non-synonymous variants in *ATPase6* or *cyt b* was described and it was further hypothesized that neurological complications in LHON relate to the synergic role of co-existing mtDNA variants or mtDNA haplogroup [127, 129, 141]. Nevertheless, none of the studies have considered the possible influence of modifying variants in nDNA.

1.5.4 DOA

Dominant Optic Atrophy (DOA, OMIM 165500) is the most prevalent hereditary optic neuropathy with an estimated prevalence ranging from 1: 12,000 to 1: 50,000 [142, 143].

1.5.4.1 Etiology

OPA1 is the major gene responsible for DOA (Figure 15) and it was initially considered as unique. However, several other loci and genes associated with DOA or optic atrophy have been identified up to date, with dominant, recessive or even X-linked mode of inheritance (Table 5). Although all of these primarily present with optic atrophy, some of them may be distinguished by the presence of associated features [144] (Table 5).

Tab. 5 OPA Genes and loci.

Locus	Chromosome	Gene	Inheritance	ON	OPA plus	Possible *plus* symptoms	Ref.
OPA1	3q28-29	*OPA1*	AD	Y	Y	HL, PN, MS-like, myopathy, CPEO	[145]
PA2	Xp11.4-p.11.21	-	XL	Y	N	-	[146]
OPA3	19q13.2-q13.3	*OPA3*	AD AR	Y	Y	-	[147]
OPA4	18q12.2-q12.3	-	AD	Y	N	-	[148]
OPA5	12p11.21	*DNM1L*	AD	Y	N	-	[149]
OPA6	8q21-q22	-	AR	Y	N	-	[150]
OPA7	11q14.1-q21	*TMEM126A*	AR	Y	Y	HL, CMP	[151]
OPA8	16q21-q22	-	AD	Y	Y	HL, CMP	[152]
OPA9	22q13.2	*ACO2*	AR	Y	Y	Encephalopathy, CA	[153]
OPA10	6q21	*RTN4IP1*	AR	Y	Y	Ataxia, PMR, seizures	[154]
OPA11	10p12.1	*YME1L1*	AR	Y	Y	Ataxia, PMR, Encephalopathy	[155]

CA, Cerebellar Atrophy; CMP, Cardiomyopathy; CPEO, Chronic Progressive External Ophthalmoplegia HL, Hearing Loss; MS-like, Multiple Sclerosis-Like Syndrome; N, No; ON, Optic Neuropathy; PMR, Psychomotor Retardation; PN, Peripheral Neuropathy; Y, yes; Ref., Reference; S., Syndrome

OPA1-associated optic atrophy is considered as purely dominant type, although very few patients carried confirmed compound heterozygous *OPA1* mutations, usually associated with very severe phenotype [144]. The *OPA1* gene consists of 30 coding exons 1 - 28, 4b and 5b (Figure 16). Exons 4,4b and 5b are alternative, responsible for

eight existing isoforms composed of 924 - 1015 amino acids [156]. The relative abundance of the resulting four different splice variants is tissue-dependent [156]. Moreover, these isoforms undergo post-translational cleavage resulting in the accumulation of 5 apparent OPA1 protein isoforms [156-160].

Up to now, more than 200 different *OPA1* mutations have been identified. Among 295 patients with *OPA1* mutations, 27 % mutations were reported to be missense, 27 % splice variants, 23.5 % led to frameshift, 16.5 % were nonsense and 6 % were deletion or duplication [161]. Nonsense, frameshift and splice site mutations often lead to haploinsufficiency through creation of premature termination codon and resulting nonsense mediated mRNA decay. The direct consequence of the 50 % OPA1 reduction is the unpredictability of the genotype/phenotype correlations [162]. The variable expression both between and within families [163] must be caused by secondary nuclear genes or other environmental modifying factors. On the other hand, missense as well as in-frame mutations do not lead to reduction of the mutant transcript [164]. Contrarily, it seems that missense mutations in the Guanosine Triphosphate (GTP)-ase domain of *OPA1* are responsible for syndromic cases with severe dominant negative effects [165]. However, it is very difficult to predict the impact of mutation without further examination at mRNA and complementary DNA level. In this way, some mutations, which may otherwise affect only a single amino acid, can have extensive consequences in the final protein function. For a canonical splicing, a donor site (5' end of the intron), branch site (near the 3' end of the intron) and an acceptor site (3' end of the intron) are required. Some of the point mutations previously evaluated as missense affect highly conserved GU or AG exon-intron boundaries and result in altered splicing and, therefore, haploinsufficiency.

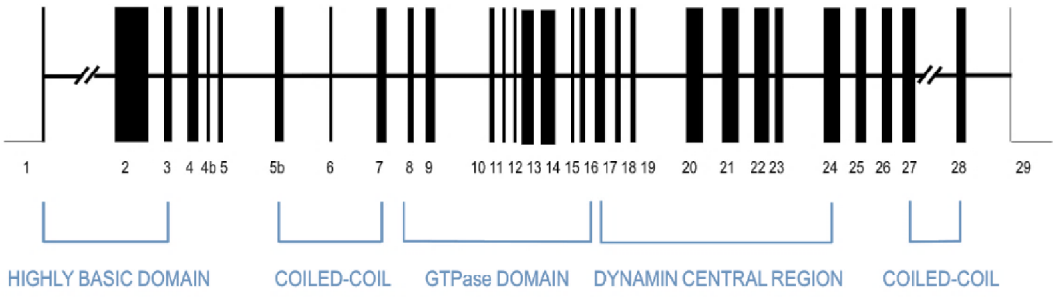


Fig. 15 Structure of human *OPA1*. Black boxes and numbers depict *OPA1* exons. Adapted from [166].

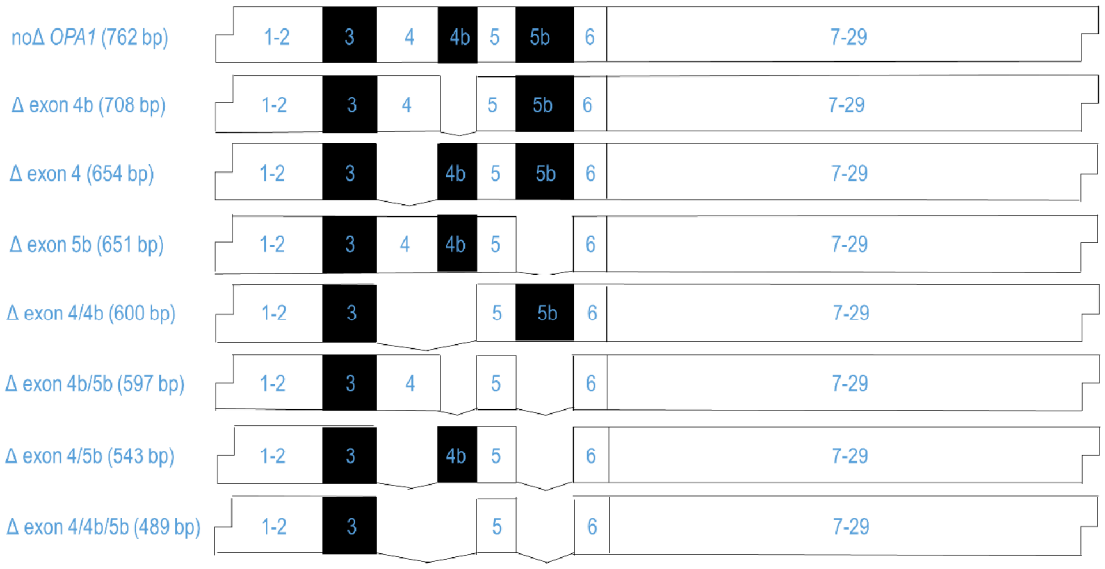


Fig. 16 Schematic representation of the structure of the eight alternative transcripts of *OPA1*. Adapted from [166].

1.5.4.2 Clinical presentation

OPA1 encodes for one of the four large dynamin-related GTPases involved in mitochondrial membrane dynamics and quality control including the cytochrome *c* release during apoptosis. In addition, the 8 *OPA1* isoforms that result from alternate splicing, have other discrete functions in structuring the cristae, maintenance of the membrane potential, calcium efflux, interaction with the respiratory chain complexes and maintenance of mitochondrial genome integrity [167-171]. *OPA1* as a nuclear gene need to be imported into the mitochondria where it resides in the intermembrane space associated to the inner membrane [157]. Although OPA1 is ubiquitously expressed, its mutation primarily influences RGC.

DOA usually manifests within the first two decades of life with painless bilateral visual deterioration and tritanopia/generalized dyschromatopsia. The probability for mutation carriers to develop symptoms during lifetime has been estimated at 84 - 88 % without any gender bias [172, 173]. Compared to LHON, the progression in DOA is slow, insidious with variable visual outcome ranging from asymptomatic to legal blindness between and within families [163]. Based on the RNFL measurements, it was postulated that age-related loss of fibers (although similar to healthy controls) may be responsible for delayed visual decline in patients with stable optic neuropathy [174].

Spontaneous visual recovery is extremely rare in DOA [144] and, similarly, asymmetry between fellow eyes is uncommon. On fundoscopic examination, the optic disk typically presents a bilateral and symmetrical pallor temporally/diffusely, usually with apparent excavation. Extraocular neurological complications in DOA (DOA *plus*) have been described in up to 30 % of carriers [165, 173] and they may involve sensorineural deafness, ataxia, myopathy, peripheral neuropathy, external ophthalmoplegia, spastic paraparesis and multiple sclerosis-like illness.

1.5.5 Therapeutic management in LHON and DOA

Therapeutic management of LHON and DOA type 1 is still limited [175, 176]. A detailed description of therapeutic options in these MON can be found in the article by Magner, Kolarova *et al.* (Supplement 2). Recent studies found benefits from quinone analogs (idebenone) enabling to bypass the complex I defect and exert the antioxidant effect in both LHON and DOA type 1 if used during the early phase of the disease [177, 178]. Idebenone has been reported to be effective in ameliorating color vision and increasing the rate of recovery in LHON, especially if the patients are treated not later 5 years after the disease onset [179]. Improvement of color vision, reduction of the central scotoma and increase of visual acuity were also found in five out of seven idebenone-treated patients with DOA type 1 [180]. On the top of that, the latest studies have shown that α-tocotrienol quinone (EPI-743) holds promise with improved pharmacologic properties [181]. In a group of 5 subjects treated with EPI-743, 4 demonstrated stabilization of disease progression and reversal of visual loss. Moreover, two patients exhibited a total recovery of visual acuity [182]. These findings are very promising and highlight the importance of early diagnosis. Nevertheless, incomplete penetrance, in addition to variable clinical manifestation, causes substantial differential diagnostic difficulties and often leads to delay in therapy. Moreover, to date, many aspects of the pathomechanism of LHON and DOA type 1 remain unclear. Identifying risk factors and molecular mechanisms that respond to energetic failure coming about in MON would help in searching for patients at risk of disease manifestation, as well as in devising optimal diagnostic strategies and follow-up guidelines.

Gene therapy in LHON

In September 2015, GenSight Biologics S.A. received acceptance from Food and Drug Administration (FDA) to enter phase III trial with GS010 gene therapy of LHON due

to m.11778G>A mutation. The two trials concerned patients with an onset of vision loss up to 6 months and between 6 and 12 months, respectively. The therapy is based on a single intravitreal injection of Recombinant Adeno-Associated Virus 2 carrying ND4 (rAAV2-ND4). The first study conducted by the group of Wan showed promising results with significant ameliorations in visual acuity and visual field [183]. However, this was not accompanied by improvements in RNFL measured by SD-OCT or VEP. Interestingly, the degree of improvement in optical function in these patients was dependent more on the degree of remaining optic nerve and RNFL function and not on the duration of the disease. A long-term, multicenter, and large-sample size study is necessary to confirm the potential of LHON gene therapy [183].

Centered care of patients with LHON and DOA type 1 was not established in the Czech Republic and there was no coordination of optimal diagnostic procedures either. Only a handful of patients with genetically-confirmed LHON and DOA benefitted from the regular follow-up care at our institution. Establishing a system to follow up patients with MON is of crucial importance in the Czech Republic.

2 AIMS OF THE THESIS

Our laboratory has primarily focused on the study of MD and over its twenty-five years of existence, we have diagnosed over 600 of patients with such conditions. One of our unique efforts since the last two decades is concentrated on the research of mitochondrial biogenesis within foetal and neonatal period which is supported by several important scientific papers [43, 44, 184, 185]. Better understanding of molecular mechanisms involved in mitochondrial dysfunction within these critical developmental spans may enable prenatal testing or the development of new therapeutic approaches. Another practical impact is distinguishing between primary and secondary mitochondrial disturbances. Especially in the perinatal period, study of mitochondrial proliferation and differentiation may help us to create theoretical basis for providing better care of very premature neonates.

Although efficient causal treatment is often not yet available for the majority of our child and adult patients with primary MD, recent advances have allowed for stabilizing the disease progression or even improving the rate of recovery of a great group of MON. Due to their progressive character, therapy should be initiated in the early phase of the disease before irreversible tissue damage occurs, which implies prompt diagnosis. However, MD are a challenge because they are probably the most diverse human disorders at every level: clinical, biochemical or genetic, and physicians of first contact are not often familiar with their manifestation, which leads to the diagnostic delay or even misdiagnosis. The creation of specialized centers, as it is at our department, is of utmost importance.

Department of Paediatrics and Adolescent Medicine is focused on diagnostics and treatment of other mitochondrial and non-mitochondrial rare diseases. We were involved in discovery and characterization of several novel rare diseases. One of our great scientific achievements was the identification and clinical description of TMEM70 as a novel factor of ATPase biogenesis [60, 69, 186]. We revealed a novel subtype of congenital disorders of glycosylation caused by NgBR deficiency [187] and we were also engaged in the description of Doublecortin Domain Containing 2 [188] and Inosine Triphosphate Pyrophosphatase deficiency [189] as a cause of renal-hepatic

ciliopathy and infantile encephalopathy, respectively. A concentrated effort and cooperation of specialized clinicians, biochemists and molecular geneticists is often needed in establishment of a correct diagnosis of rare disease. Our Department is one of this kind in the Czech Republic.

The specific aims of the thesis were:

A) to **characterize mitochondrial biogenesis in an organ-specific manner** in order to improve our understanding of the adaptation processes within the foetal development, childhood, as well as the adult life, which could be beneficial especially in evaluation of primary and secondary mitochondrial pathologies;

B) to **establish a *National medical care Center for patients with mitochondrial optic neuropathies*** with regard to optimize the diagnostic, management and therapeutic strategies; to **define clinical, biochemical and genetic aspects in patients suffering from optic neuropathy** or other eye involvement based on a mitochondrial dysfunction;

Specific attention was paid:

a) to **describe extraocular features and changes in peripapillary capillary network by SD-OCT-A in LHON patients,**

b) to **provide the information about the natural course of MELAS and its overlapping phenotypes** with particular focus on ocular involvement and sequence of clinical features for the purpose of improving the predictive value of symptoms in patients with this mitochondrial disorder,

c) to **determine molecular genetic cause in a group of patients with bilateral optic atrophy and to interprete the mutation pathogenicity of *OPA1* rare variants** so as to understand better the diverse mechanisms implicated in the disease pathogenesis.

C) to **describe pathobiochemical and molecular aspects of selected rare inherited errors of metabolism** with the objective of providing earlier diagnosis, well-time therapy initiation, proper management and genetic counselling.

3 MATERIALS AND METHODS

See individual articles and submitted manuscripts in the Supplement for the detailed description. Here, only basic principles of used methods are mentioned. The work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) after approval was granted by the Committee of Medical Ethics at the General University Hospital in Prague. Informed consent was obtained for experimentation with human samples.

3.1 Material

3.1.1 Related to the aim A) Mitochondrial biogenesis

The study (Supplement 3) involved a set of 25 liver and 18 skeletal muscle samples at gestational age ranging from the 14th to 29th weeks, that were collected subsequently to the termination of pregnancy for genetic indications unrelated to OXPHOS deficiency. Moreover, to find out whether marked changes of transcription capacity will be reflected in mitochondrial function, our results were divided in two specific groups with 22nd GW developmental point. Another 5 liver samples were included for additional analysis of haematopoietic activity. The second study (Supplement 4) examined 205 skeletal muscle tissue samples from 107 males and 98 females that were obtained from individuals between 2 weeks and 78 years of age. Similarly, all the samples were collected from individuals suspected of MD that was subsequently ruled out due to normal respiratory chain activities.

3.1.2 Related to the aim B) Mitochondrial optic neuropathies

3.1.2.1 Patients

A detailed neuroophthalmic examination of 54 patients (20 symptomatic) with LHON, 17 symptomatic patients with DOA, 33 patients with MELAS and 10 patients with ON of unknown origin was performed within a period of 3 years in National Center for Patients with Mitochondrial Optic Neuropathies (Supplement 5-11). Patients are centralized from all regions of the Czech Republic and Slovakia. A total of 6 individuals

(2 symptomatic males with m.11778G>A and 1 with m.14484T>C; 2 asymptomatic males and one asymptomatic females) with LHON from four families and six healthy controls were enrolled in the study of peripapillary microcirculation by OCT-A (Supplement 6). Our patients with DOA were included in the international project investigating a total of 44 probands of British, Canadian and Czech origin and one proband of Czech Roma origin with bilateral optic atrophy. These patients were referred with the diagnosis of bilateral optic atrophy to the All Wales Genetic Testing service, University Hospital of Wales and General University Hospital in Prague for laboratory investigation (Supplement 9).

3.1.2.2 Clinical samples

Urine, peripheral blood, hair follicles and buccal smear samples were obtained from all subjects in order to perform genetic analyses, metabolic profiling, to determine the heteroplasmy level of pathogenic mtDNA mutations and mtDNA content analysis.

Muscle biopsy

Since the participation and spatial distribution of fibre types (and therefore the metabolic demands) vary between different muscle groups, it is crucial to know the precise bioptic place. Moreover, fibre typing may vary even during adulthood [190]. The normal ratio of type I to type II myofibers at about 2/3, is relatively uniform for most biopsy sites, except for the deltoid, soleus and rectus abdominis sites, where type I predominance is normal [191]. Nevertheless, only the stable examination of the medial head of musculus gastrocnemius that constitutes of mean 50.8 % of type I and 49.2 % of type II [192], was performed.

Biopsy of foetal liver

Considering that foetal blood flow through hepatic artery is negligible (see above), the most highly oxygenated blood of the foetus enters the liver from the left umbilical vein. Right umbilical vein regresses shortly within the development. As a consequence, the left lobe is ten-fold larger than the right lobe [193] and showed smaller amount of haematopoietic tissue within the foetal development. According to Emery, the average amount of haematopoiesis in the left liver lobe at 29 weeks is equivalent to that in the right liver lobe at 33 weeks [193]. We have allowed for the discordant vascular development and only stable examinations of right liver lobes were performed.

3.1.3 Related to the aim C) Pathobiochemical and molecular aspects of selected rare inherited errors of metabolism

3.1.3.1 Patients

A total of two Czech siblings and one child of Russian origin with LPL deficiency were described in the Supplement 12. For the Supplement 13, the analyzed group consisted of patients enzymatically and/or genetically diagnosed with various types of Glycogen Storage Diseases (GSD; total: n = 24; 2x Type 0, 7x Type Ia, 3x Type non-Ia, 7x Type III, 5x Type IX; multiple samples were taken from some individual patients, totalling 39 samples), two subjects with Hypertriacylglycerolemia (HTG) due to familial LPL deficiency and one individual with HTG of unknown origin. All of the GSD patients were on standard treatment.

3.1.3.2 Samples

In both studies, blood was obtained from the tested patients and in the case of Supplement 12 also from their 4 parents with informed consent from each participant or their parents. Serum was separated by centrifugation (630 g, 10 min) and stored at -20 °C until analysis. Additionaly, to find out whether Isoelectric focusing (IEF) of Apolipoprotein C-III can be performed alternatively in plasma, new samples of both serum and plasma were paralelly collected from 13 of the patients (GSD Types Ia, non-Ia, III and IX) and analyzed.

3. 2 Methods

3.2.1 Tissue homogenization

The muscle tissue (300 - 500 mg) was homogenized on ice in isolation buffer (1:20 wt/vol). Tissue was minced by precooled scissors and homogenised using a Potter-Elvehjem polytetrafluoroethylene/glass homogenizer.

3.2.2 Isolation of mitochondria

Mitochondria from liver and muscle were isolated from 5% tissue homogenates (wt/vol) according to the standard differential centrifugation procedure [194]. Freshly

isolated mitochondria were used for activity evaluation and the rest of samples were kept at -80 °C for other analyses.

3.2.3 Respiratory enzyme activities

Activities of respiratory enzymes COX, SQR, and Citrate Synthase (CS) were measured spectrophotometrically in isolated mitochondria (Supplement 3) and in both homogenates and isolated mitochondria (Supplement 4) as described elsewhere [195]. The enzyme activities data are expressed both as specific activity normalized to protein concentration and as ratio to mtDNA content. Protein concentration was determined by the method of Lowry [196].

3.2.4 MtDNA content

The quantification of mtDNA was executed by the method well established in our laboratory and previously described in detail [197] (Supplements 3, 4).

3.2.5 DNA isolation

Total DNA was extracted by standard phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation or using a QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. DNA was stored at 4 °C. The quality and concentration of total DNA was checked by NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, USA) (Supplements 5, 8, 9, 10, 12).

3.2.6 Molecular genetics analyses

The heteroplasmy level of mtDNA mutations was determined by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism in all available samples, i.e. blood, hair follicles, muscle, buccal cells and Urothelial Epithelial Cells (UEC) from patients with both MELAS or LHON and the one patient with LHON/MELAS overlap syndrome. Targeted sequencing of the characterized mitochondria- and hyperlipidemia-related genes was performed for the latter on a SOLiDTM 4 System (Life Technologies, Massachusetts, USA) using a custom SeqCap Enrichment kit according to the manufacturer's protocol. PCR amplification and bidirectional Sanger sequencing of the *OPA1* coding regions and intronexon boundaries was performed in probands. Exome sequencing was performed as described previously [198] using 3 μg of DNA from patients with LPL deficiency and their parents. For DNA enrichment, SureSelect All Exome Kit (Agilent,

Santa Clara, CA) was used according to the manufacturer's protocol. Prioritized variants were confirmed by Sanger sequencing (Supplements 5, 7, 8, 9, 10, 12).

3.2.7 Interpretation of the *OPA1* mutation pathogenicity

Frequency of the changes detected in this study (Supplement 9) was searched in the following population databases: The Exome Aggregation Consortium (ExAC) (http://exac.braoadinstitute.org) showing exome sequencing data from more than 60,000 unrelated individuals and The Exome Variant Server (EVS, NHLBI Exome Sequencing Project; http://evs.gs.washington.edu/EVS/), which includes data from more than 6,000 individuals (both accessed 7 May 2016). Only rare variants (i.e. minor allele frequency ≤ 0.001) were further evaluated for potential pathogenicity. Variants predicted to lead to an absence of the gene product due to the mRNA nonsense-mediated decay mechanism (e.g., nonsense or frameshifting mutations located 50-55 bp upstream from the last intron-exon junction) were considered as pathogenic. The pathogenicity of missense variants was predicted using various algorithms listed in the original article. Novel *OPA1* missense variants with no entry in ExAC and EVS and predicted harmful by at least three tools were regarded as pathogenic. The wild-type and mutated sequences were analysed by splice site prediction tools: Human Splicing Finder [199], NNSPLICE [200], MaxEntScan [201] and NetGene2 [202]. Mutations leading to the disruption of splice site predicted by at least three out of the four tools used were considered pathogenic.

3.2.8 Haematopoiesis

Small blocks of liver tissue were taken at autopsy 30 to 120 min post-mortem and fixed in 10 % paraformaldehyde, embedded in paraffin. Serial ultrathin sections (6 μm) were cut and fixed doubly stained with haematoxylin and eosin. Using stratified sampling method [203], a complete yield was 30 images for one foetal liver sample under constant conditions at 40× magnification of the objective. Haematopoietic amount was expressed as a proportion of haematopoietic islands to photographed field of view. Cell's surface was quantified as mean optical density of analysed areas as determined by the densitometric program CellSens Dimension 1.6 (Olympus, Tokyo, Japan) (Supplement 3).

3.2.9 Enzyme histochemistry

Muscle tissues were snap frozen in isopentane (2-methylbutane; Sigma–Aldrich Co., Munich, Germany) and cooled in liquid nitrogen. To evaluate the histopathological changes in the muscle tissue, at least five 3 μm cryosections from each tissue block were examined by routine haematoxylin–eosin staining and a conventional spectrum of histochemical reactions including adenosine triphosphatase (at preincubation pH values of 10.4, 4.6, 4.3), NADH dehydrogenase-tetrazolium reductase, SDH and periodic acid-Schiff with diastase digestion, detailed elsewhere [204] (Supplement 5, 8).

3.2.10 Ophthalmic and neuroophthalmic examination

All subjects with optic neuropathy underwent ocular examination including measurement of Best-Corrected Visual Acuity (BCVA) using Early Treatment Diabetic Retinopathy Study charts and extrapolated into decimal values. Visual field was assessed using the Medmont automated perimeter (M-700 Medmont International, Vermont, Australia). Next, we performed Fundus examination in dilation and SD-OCT (Spectralis, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) of the macula and peripapillary RNFL, thickness measurements by circular scans 3.5-3.6 mm in diameter around the optic disc. The normal range of global RNFL thickness was regarded as 97.41±11.73 μm in children and 97.52±9.83 μm in adults as well as 90.44±20.49 μm in children and 83.65±14.98 μm for temporal quadrant [205]. Colour vision was tested using Lanthony desaturated 15 hue test (more than one major crossing was considered as abnormal reference) [206] and contrast sensitivity with Pelli-Robson charts (values <1.50 were regarded as abnormal) [207]. All patients underwent VEP and brainstem auditory evoked potentials analysis, EMG and ECG studies (Supplement 5, 6, 7, 8, 9, 10).

3.2.11 Peripapillary microcirculation in LHON

All subjects underwent ophthalmic examination and SD-OCT-A (Spectralis OCT2, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) that was performed between February and April 2017 by one skilled technician. The scans with a 3x3 mm field of view were centered on the optic disc. Images from several depths were compared between eyes (Supplement 6).

3.2.12 LPL concentration

The immunoreactive LPL concentration (mass) was measured in the serum before and 15 minutes after intravenous injection of heparin (30 IU/kg of body weight, Heparin, Léčiva™, Zentiva, Prague, Czech Republic). LPL was analysed by a sandwich ELISA kit according to the operating instructions (Lipoprotein Lipase Elisa, ALPCO Diagnostics, Salem, NH) (Supplement 12).

3.2.13 Analysis of ApoC-III and transferrin by isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

IEF of ApoC-III and Western blotting was carried out as described previously, and the profiles were evaluated using the determined reference range in [208]. IEF of Transferrin (TF) and SDS-PAGE of ApoC-III was performed according to Wopereis et al. [209] and and the Western blotting of ApoC-III as in [208]. Neuraminidase treatment of ApoC-III in a control sample was performed by mixing 4 µl of serum with 1 µl of neuraminidase (Roche, 11585886001, 10 U/ml), followed by overnight incubation at laboratory temperature. The acquired profiles of the proteins' glycosylated isoforms were quantified densitometrically using AlfaDigiDoc (Alpha Innotech) for TF and Quantity One (Bio-Rad) for ApoC-III. TF glycosylated profiles were labelled as normal, borderline or pathological according to our laboratory's internal reference range that was determined for the method (Supplement 13).

3.2.14 Analysis of ApoC-III by MALDI TOF mass spectrometry

Mass Spectrometry (MS) analysis of ApoC-III glycan structures in the serum samples was performed as described previously [210]. For further detail see Supplement 13.

3.2.15 Statistical methods

Statistical methods are described in detail in individual articles and submitted manuscripts.

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Results and discussion related to the aim A) Mitochondrial biogenesis

The list of articles:

Supplement 3] ***Kolarova, H.***, *Krizova, J., Hulkova, M., Hansikova, H., Hulkova, H., Smid, V., Zeman, J., Honzik, T., Tesarova, M.* ***Changes in transcription pattern lead to a marked decrease in COX, CS and SQR activity after the developmental point of the 22nd gestational week.*** *Physiol Res 67 (in press). IF 1,643*

Supplement 4] *Hulkova, M., Krizhova, J.,* ***Kolarova, H.****, Berankova, K., Zeman, J., Hansikova, H., Tesarova, M.* ***Sex differences in mtDNA content and its effect on mitochondrial enzyme activities in the context of human skeletal muscle aging.*** *Aging Dis (submitted).*

Author's contribution: evaluation of haematopoietic activity in foetal liver samples (3), biochemical analyses of selected respiratory enzymes (3, 4) and manuscript preparation (3).

4.1.1 Developmental changes of COX, CS, SQR and mtDNA in human foetal tissues

Reevaluation of the expression data [184] using Quadratic regression model revealed significant increase in *COX4* and *MT-ATP6* transcription levels in liver after the 22nd GW (Figure 17 A, B). This finding prompted us to characterize several markers of mitochondrial biogenesis throughout the human foetal development with its time and tissue specific changes. Specific activities of three mitochondrial enzymes COX, CS, SQR and mtDNA were studied in a set of 25 liver and 18 skeletal muscle samples between the 14th and 29th GW. We did not find any significant correlation between gestational age and specific enzyme activities (Figure 18 A, B, C); mtDNA amount positively correlated with the age of gestation only in liver ($p=0.011$) (Figure 17 C). Interestingly, following the pattern of increasing gene expression after the GW 22, we could clearly observe a marked drop in COX activity ($p=0.003$) in the liver tissue (Figure 19 A). However, at the same time, its transcript levels started increasing. From these inverse processes and considering stability of COX subunits protein levels, we can speculate that around the 22nd GW major, possibly regulatory changes in COX (OXPHOS) biogenesis proceed especially on the post-translational level. Similar time-specific changes in both studied tissues were observed for CS (liver: $p=0.003$ in liver, muscle: $p=0.034$, Figure 19 C, D) and SQR (liver: $p=0.005$, muscle: $p>0.05$) (Figure 19 E, F) which may be due to the increasing importance of mitochondrial β-oxidation in foetal life. Based on our results, we suggest, that sufficient level of mtDNA and mitochondrially-encoded transcripts accumulated throughout the gestation, but mainly after 22nd GW, are crucial for adequate onset of respiration after birth, and, on the contrary, that its inadequate capacity leads to high mortality of children born before this specific developmental point. Translational activity reflected in enzyme specific activity would rather stay behind the scene to give off for more effective energy production early after birth. In addition, liver haematopoiesis was surveyed by light microscopy to find out whether it can affect our data (Figure 20). We observed a moderate, continuous decline of haematopoietic activity from the 14th to 24th GW with maximum of 15 % at the beginning of the studied period (Figure 20 A, B). Since there was no correlation between OXPHOS specific activities and haematopoietic activity (Figure 20 C), the documented developmental changes of respiratory chain enzyme activities are not affected by concomitant haematopoiesis and, above all, reflect processes in the liver tissue.

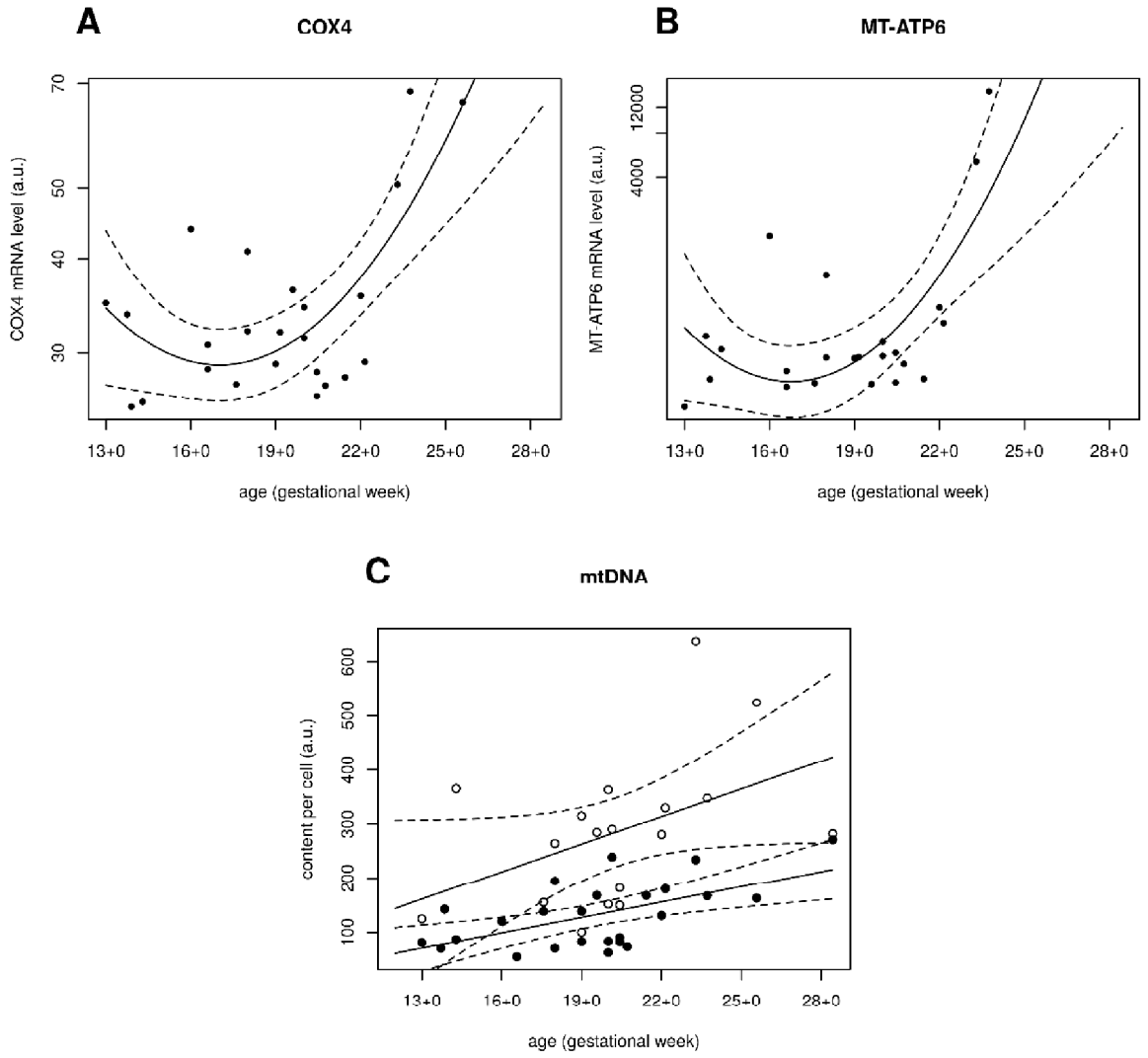


Fig. 17 Expression levels of *COX4* and *MT-ATP6* mRNA (A, B; Quadratic regression)**. Time-specific differences in mtDNA content per cell in liver and skeletal muscle (C**; Spearman's correlation)**.** Black points: liver; Blank points: muscle; mtDNA, mitochondrial DNA

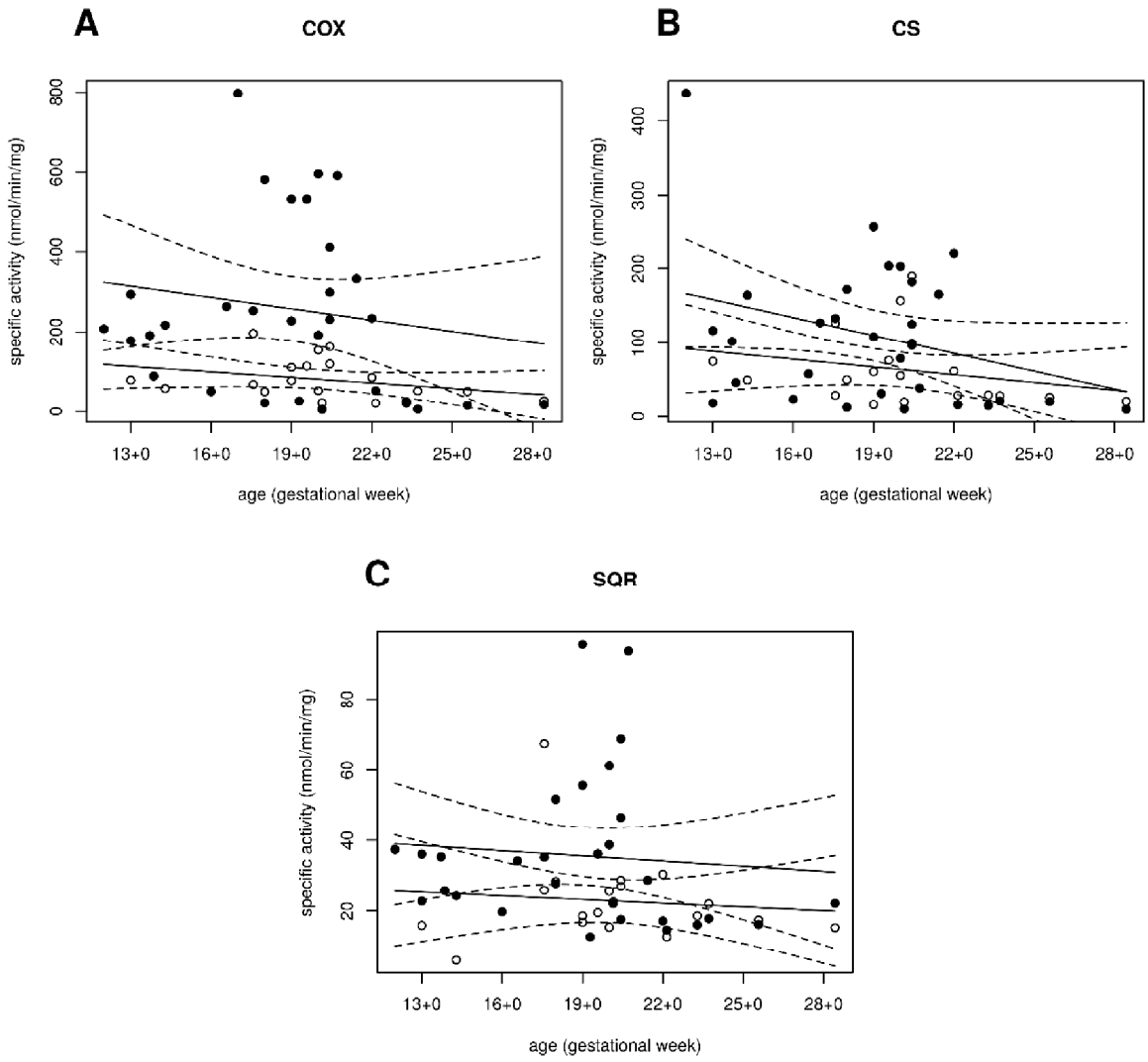


Fig. 18 The relationship between the age of gestation and the enzyme specific activities in mitochondrial fraction (Spearman's correlation). Black points: liver; Blank points: muscle; COX, Cytochrome *c* Oxidase; CS, Citrate Synthase; SQR, Succinate Coenzyme Q Reductase

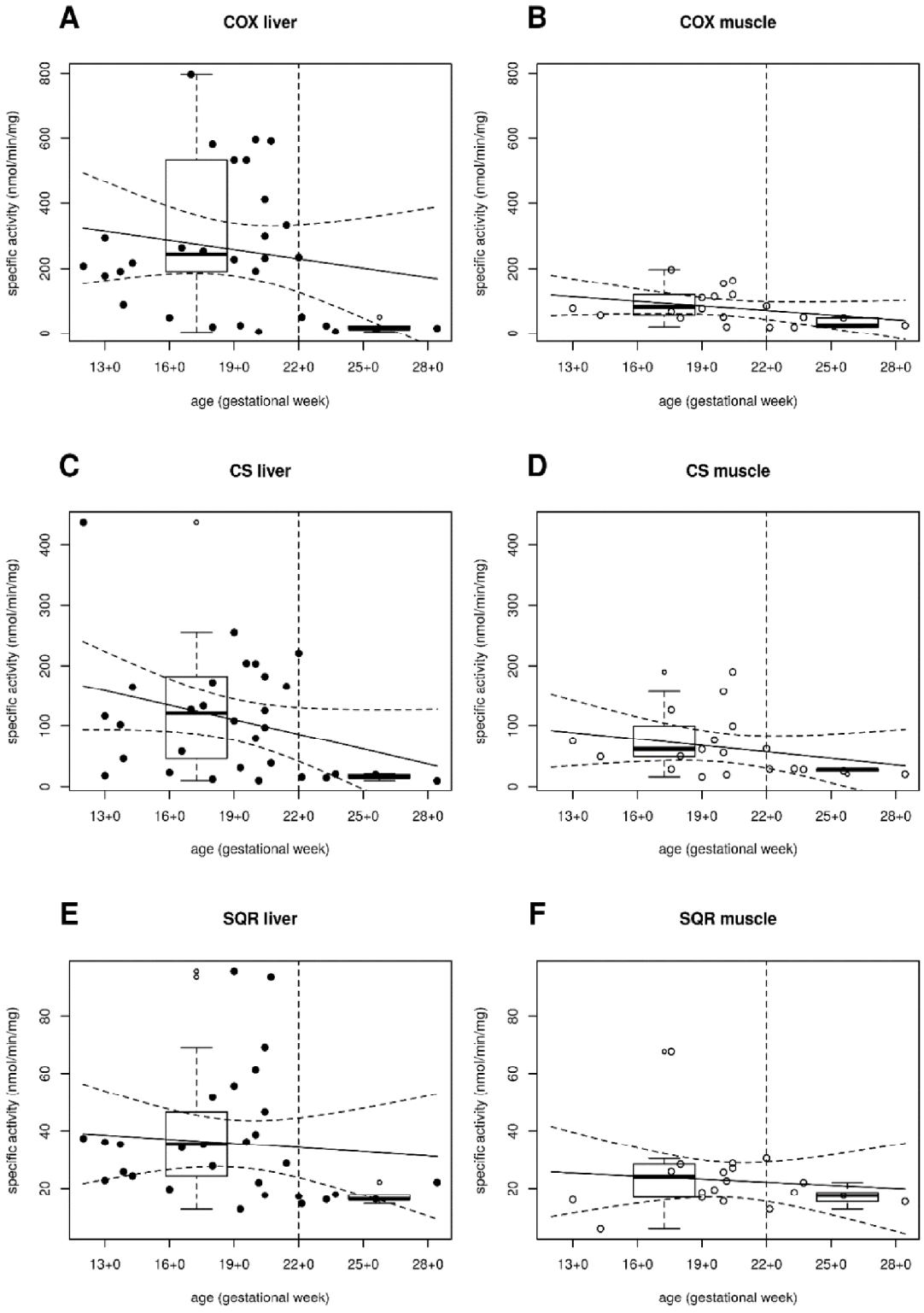


Fig. 19 Tissue specific differences in COX, SQR and CS enzyme activities in isolated liver and muscle mitochondria divided in two groups with a critical point at 22nd gestational week. Black points: liver; Blank points: muscle; COX, Cytochrome *c* Oxidase; CS, Citrate Synthase; SQR, Succinate Coenzyme Q Reductase

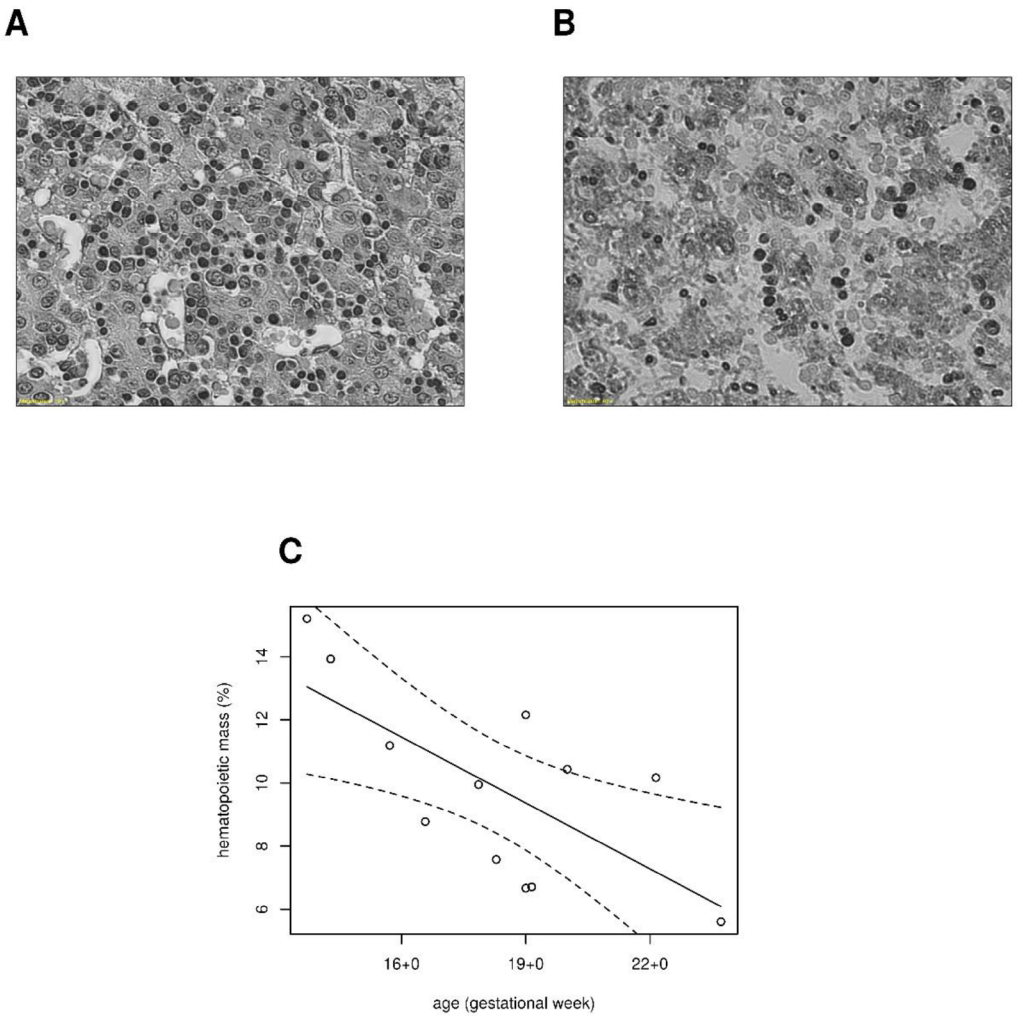


Fig. 20 Fully established haematopoiesis at the 3rd month of intrauterine life (A). Sparse haematopoietic islands at the end of the 2nd trimester (B). **The amount of haematopoietic activity in liver [%] from 14th to 24th gestational week** (Spearman's correlation) **(C).**

4.1.2 Age and gender-related differences in mtDNA content and COX, CS and SQR activities in postnatal life

The enzymatic activities (CS, COX and SQR) and mtDNA content were assessed in the set of 205 muscle samples in order to document the effect of both age and gender on the interpretation of mitochondrial functional state. A significant difference in mtDNA content was found among boys from 2 weeks up to 10 years of age and the older male groups (0-10 vs. 11-20 y: $p=0.001$; vs. 21-40 y: $p=0.005$ and vs. 41-78 y: $p=0.005$, Figure 21). The female mtDNA content per cell did not vary with age group ($p>0.05$). Spearman's correlations between age and mtDNA content were significantly positive in both group, but more distinctly in males (male: $r=0.626$; $p=0.001$; female: $r=0.275$; $p=0.008$). In both groups, no significant age group dependency was detected in the activities of COX, CS and SQR. Nevertheless, the enzyme activities normalized to mtDNA showed a downward trend through lifetime in the male group (Figure 22). This, rather unexpected finding, could indicate that skeletal muscle loses its efficiency to produce enzyme specific activity per mtDNA unit with age. This may represent the effect of sex hormones, respectively gender specificity, in mitochondriogenesis. Estrogens have positive direct and indirect effects on mitochondrial function and biogenesis [6, 211]. Testosterone, that has an important role in inducing protein synthesis, continuously decline after twenty years of age [212]. Therefore, the increase in mtDNA content with age could be a compensatory effect in men when mitochondrial transcription declines and oxidative stress is increasing. The sex differences in the normalized enzyme activities could reflect a distinct compensatory mechanism for age-related impairment of muscle mitochondria. One of the plausible explanations of gender-specific changes may be the differential activation of maternal and paternal gene copies during development [213]. Furthermore, since CS activity is a traditional normalization parameter of respiratory chain complexes, correlation between mtDNA content and both CS and COX activity from tissue homogenate and the mitochondrial fraction from skeletal muscle were analysed. Our results showed that COX activity positively correlated with mtDNA in both mitochondrial fraction and tissue homogenate (Figure 23), which could be explained by their direct entwining in contrast to nuclear encoded CS. We conclude that mtDNA content is a useful normalization factor for human skeletal muscle. The possible variability in CS activity in different situations should be considered when it is related to mitochondrial mass or mtDNA content.

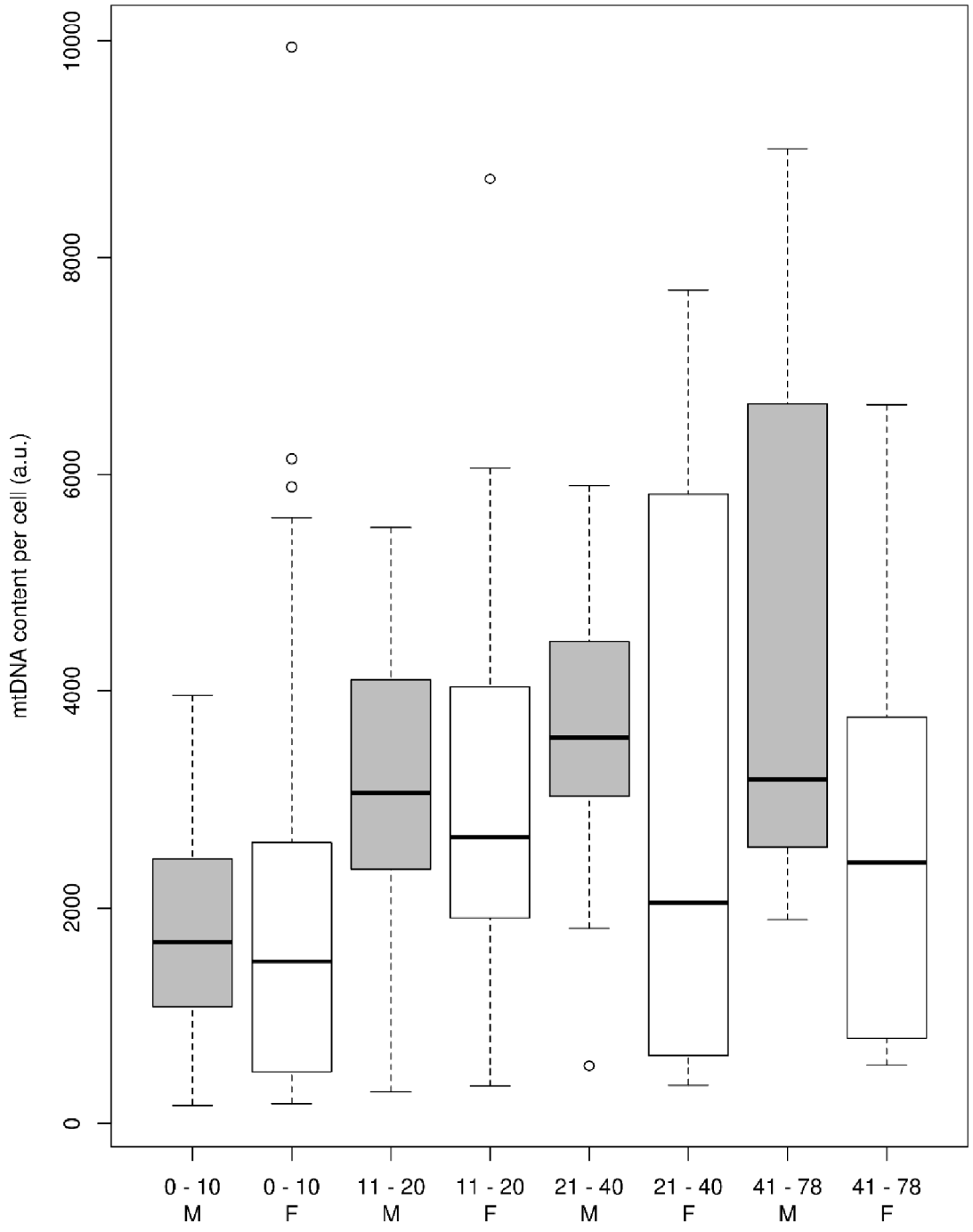


Fig. 21 The mtDNA content per cell and the specific-age groups. (Wilcoxon test and Kruskal-Wallis test). F, Female; M, Male; mtDNA, mitochondrial DNA

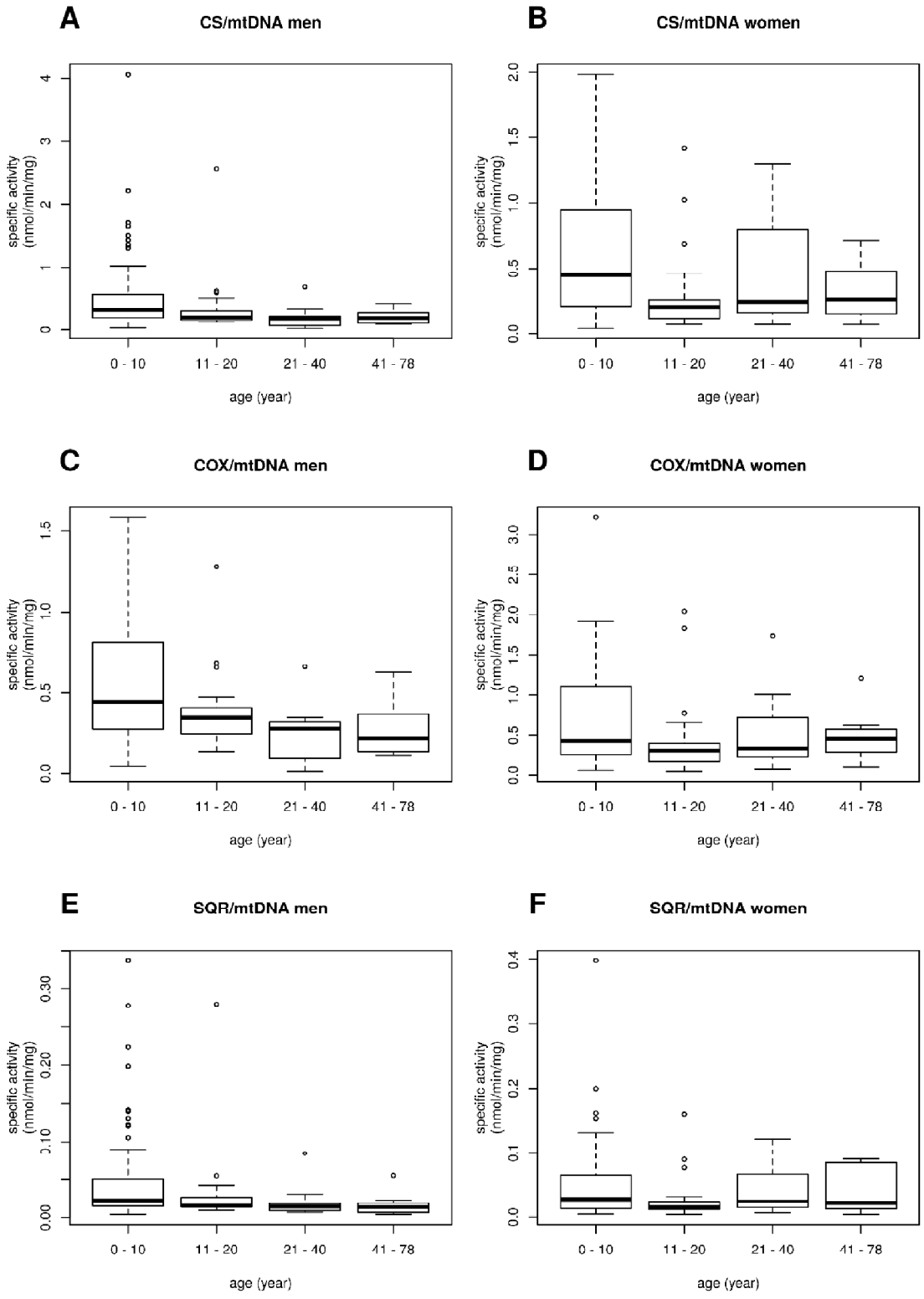


Fig. 22 The normalized activities measured in mitochondrial fraction and the specific age-groups (Kruskal-Wallis test). Normalized enzymatic activities of CS **(A, B)**, COX **(C, D)** and SQR **(E, F)** divided according to sex are presented. COX, Cytochrome *c* Oxidase; CS, Citrate Synthase; SQR, Succi-nate Coenzyme Q Reductase

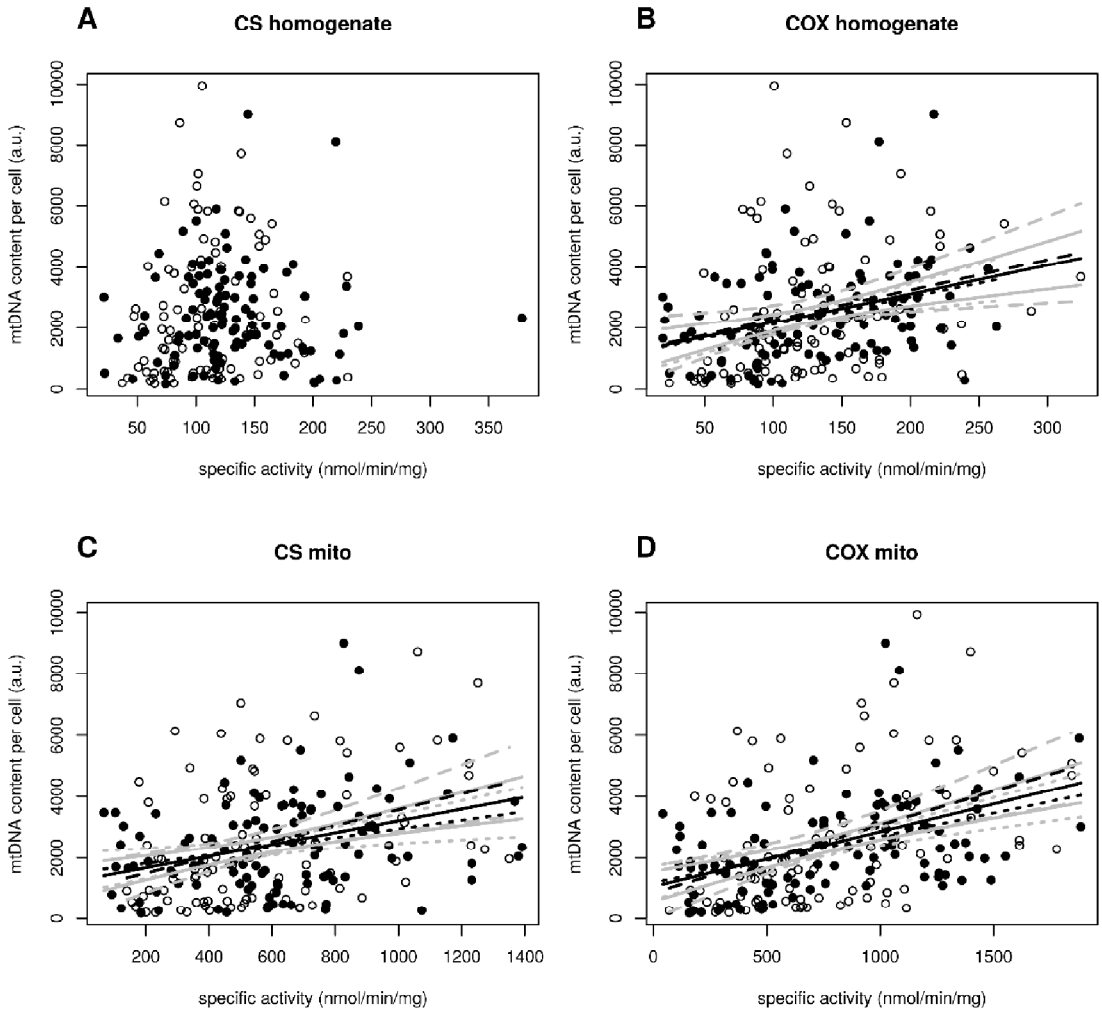


Fig. 23 The correlations between the enzyme activities of CS (A, C), COX (B, D) and mtDNA content per cell in skeletal muscle (Spearman's correlation test). COX, Cytochrome *c* Oxidase; CS, Citrate Synthase

THE MAIN POINTS RELATED TO AIM A)

I) Our study of mitochondrial biogenesis in early human development significantly supported the fact that gestational week 22 is the edge of viability, which has to be taken into account in upcoming discussions about guidelines on resuscitation of pre-term neonates.

II) Our findings of gender differences in the normalized mitochondrial enzyme activities in human skeletal muscle could reflect a distinct compensatory mechanism for age-related impairment of muscle mitochondria. One of the plausible explanations of gender-specific changes may be the differential activation of maternal and paternal gene copies during development.

4.2 Results and discussion related to the aim B)

Mitochondrial optic neuropathies; creation of specialized center for MON – study of risk factors and optimization of diagnosis and management strategy

The list of articles:

Supplement 5] ***Kolarova, H.*** *et al.* ***Extraocular features may be the essential presentation in m.11778G>A LHON carriers****. (in preparation)*

Supplement 6] *Kousal, B.,* ***Kolarova, H.****, Meliska, M., Bydzovsky, J., Kulhanek, J., Honzik T., Liskova, P.* ***Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy.*** *JAMA Ophthalmol (submitted).*

Supplement 7] *Dvorakova, V.,* ***Kolarova, H.****, Magner, M., Tesarova, M., Hansikova, H., Zeman, J., Honzik, T. (2016)* ***The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers.*** *Mol Genet Metab 118(4), 288–295. IF 3.093*

Supplement 8] ***Kolarova, H.****, Liskova, P., Tesarova, M., Vidrova, V.K., Forgac, M., Zamecnik, J., Hansikova, H., Honzik, T. (2016)* ***Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5.*** *Ophthalmic Genet 19, 1-5. IF 1.455*

Supplement 9] *Liskova, P., Tesarova, M., Dudakova, L., Svecova, S.,* ***Kolarova, H.****, Honzik, T., Seto, S., Votruba. M. (2016)* ***OPA1 analysis in a series of 44 probands with optic atrophy.*** *Acta Ophtalmol 95(4), 363-369. IF 3,032*

Supplement 10] ***Kolarova, H.****, Honzik, T., Dudakova, L., Kousal, B., Kulhanek, J., Diblik P., Tesarova M., Havrankova P., Forgac M., Zeman J., Liskova P. (2017)* ***Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON)*** *Cesk Slov Neurol N 80/113(5), 534-544. IF 0,209*

Supplement 11] *Dudakova, L., Kousal, B.,* ***Kolarova, H.****, Hlavata, L., Liskova, P. (2016)* ***Genová terapie dědičných onemocnění sítnice a zrakového nervu: Současný stav poznání. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve disorders: Current knowledge.*** *Čes a Slov Oftal 72 (4), 128-136.*

Author's contribution: clinical examination of patients (5, 6, 7, 8, 9), analysis of SD-OCT-A findings (6), evaluation of mutation pathogenicity in selected databases (9), organization of medical care center for patients with optic neuropathies (5, 6, 7, 8, 9, 10), evaluation of collected data (5, 6, 7, 8, 9) and manuscript preparation (5, 7, 8, 10)

4.2.1 Extraocular features in LHON

In our group of 54 (20 symptomatic) individuals with LHON, the average age at onset was 24 years. All but 2 symptomatic patients were men, manifesting with progressive, painless, binocular vision loss with the involvement of the fellow eye either sequentially (n=18) or simultaneously (n=2). Altogether, 16 patients were clinically asymptomatic, but detailed neuroophthalmic examination revealed discrete alterations (i.e. subclinical carriers). The remaining 18 patients were completely asymptomatic. Interestingly, extraocular symptoms were expressed in 11 carriers. All but two (symptomatic woman and man, both carrying m.3460G>A with tremor, peripheral neuropathy and myopathy, and isolated tremor, respectively) had m.11778G>A. Although extraocular symptoms were present only in symptomatic males who suffered visual failure, in women, these developed more often in subclinical individuals. Myopathy was the most common extraocular symptom and it manifested only in women. Contrarily, tremor was present in 4 males including one with other neocerebellar symptoms (dysarthria, ataxia and hypermetropy). The most remarkable feature is the dominance of extraocular symptoms over only slightly affected visual functions in a family with m.11778G>A mutation (IV/7) (Figure 24). In 4 patients with myopathy and moderate sensorineural hearing loss or peripheral neuropathy, visual impairment is completely absent (V/11, V/12, V/13) (Figure 24). In all four patients, available muscle specimen showed focal subsarcolemmal accumulation of SDH product and COX negative fibres in up to 5 % and 15 % of muscle fibres, respectively (Figure 25). Enzymology of the muscle biopsy revealed a severe complex I defect in two (IV/4 and V/11) of the patients (Complex I-III: 19-47 % of controls; Complex II-III: 39 % of controls), and decreased activity of complexes I-III to 22-39 % of lower limit of the control reference range. MtDNA sequencing performed in all family members revealed a prevalent m.11778G>A mutation, one synonymous variant m.3663A>G in *MT-ND1* (0.07 % Human Mitochondrial Genome Database, mtDB) and two non-synonymous polymorphisms m.9632A>G in *MT-CO3* and m.12083T>G in *MT-ND4* (both 0.18 % according to mtDB). Whole Exome Sequencing (WES) was performed in III/7, IV/11, V/11, V/12 and V/13 (Figure 24). None of the variants found could explain the development of extraocular symptoms. Due to their high incidence, especially in Czech female patients, we emphasize the need for their search and management even in subclinical or asymptomatic cases. Negative mtDNA sequencing and WES in our family support the exclusive role of m.11778G>A in the development of extraocular

symptoms [214]. The publication is currently under preparation as important international cooperation (Institut Imagine at Hôpital Necker Enfants Malades, Wellcome Center for Mitochondrial Research at Newcastle University, and Klinikum der Universität München concerning the problematics of extraocular symptoms in patients with MON is proceeding (Supplement 5, 14).

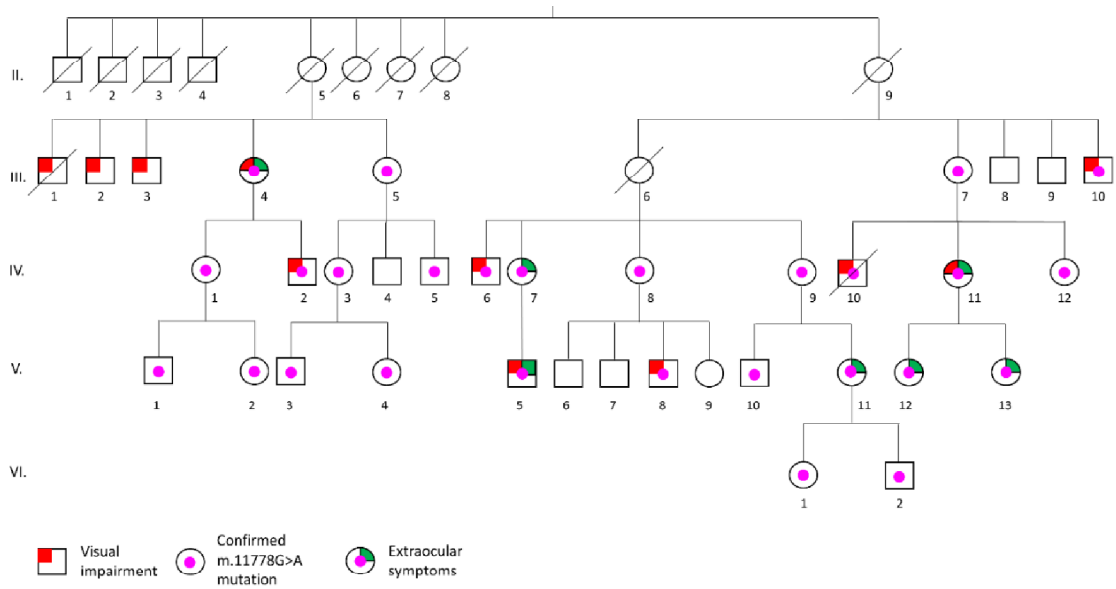


Fig. 24 Family tree of a large family with LHON syndrome based on m. 11778G>A. Interestingly, there is a high incidence of prevailing extraocular symptoms with only mildly affected visual functions (IV/11, V/12 and V/13). In three patient with histologically confirmed myopathy (V/11), visual function were not altered at all.

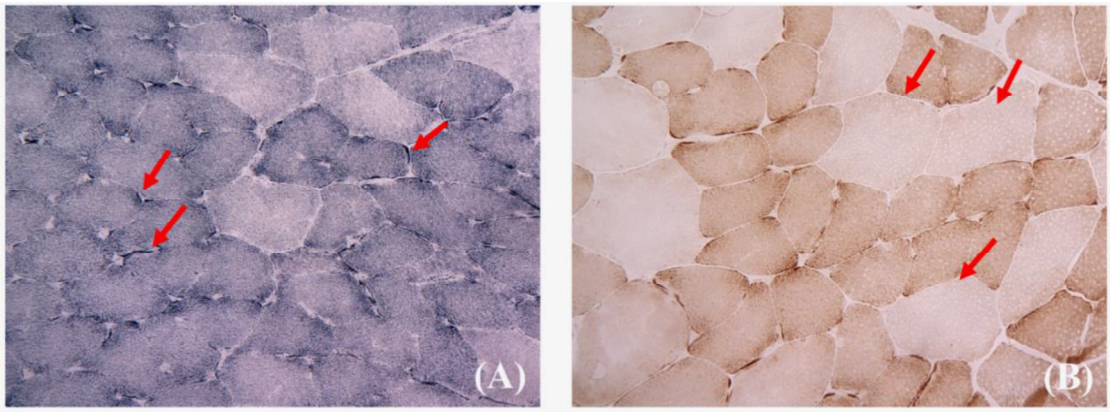


Fig. 25 Histology of muscle biopsy of a 37-year-old woman with m.11778G>A (V/11) presenting only with the extraocular phenotype. Although the presence of typical ragged red fibres was not observed in skeletal muscle histochemistry, the severity of the subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase product (marked by arrows) in a proportion of muscle fibres was moderate (succinate dehydrogenase histochemistry, original magnification 400×) **(A).** In cytochrome *c* oxidase histochemistry, there were abundant cytochrome *c* oxidase negative fibres in up to 15 % of fibres (cytochrome *c* oxidase histochemistry, original magnification 200×, indicated by arrows) **(B).**

4.2.2 Peripapillary microcirculation in LHON

In this first prospective observational comparative case series, we aimed to study the peripapillary capillary network with SD-OCT-A in LHON. To date, SD-OCT-A imaging has been shown only in three separate cases with visual loss due to LHON [215-217]. Herein, total of 12 eyes of six individuals (three affected individuals 1, 2, 3 and three unaffected mtDNA carriers 4, 5 and 6) with one of the LHON prevalent mutation were imaged and compared to 6 eyes of three healthy controls. All three affected individuals were males (two carriers of m.11778G>A and one carrier of m.14484T>C). In five affected eyes SD-OCT-A showed the reduction of radial peripapillary microvascular network that correlated with RNFL thinning and visual field loss (Figure 26). The same finding was observed in one patient (individual 3) treated with Idebenone for 14 months that underwent almost full recovery of his left eye with BCVA 0.87. Interestingly, the other eye showed normal ocular findings 14 months after onset, which is an extremely rare finding, described in the literature in very few adult cases [218-221]. Results of SD-OCT-A examination in this eye were unfortunately inconclusive due to a delineation error although a subtle papillary dropout was suggested. We have not observed any differences between unaffected mutation carriers and control eyes (Figure 26). Overall, on SD-OCT-A, the vascular network, as measured by total retinal thickness (Inner limiting membrane to Bruch membrane) demonstrated differences between the affected eyes and normal controls with a reduction of capillary density corresponding to the disease severity (Figure 27). Although subjective examination (BCVA) showed an improvement of visual functions in our patients treated with Idebenone, radial peripapillary microvascular network dropout on SD-OCT-A remained stable, similarly to study of Wan *et al.* who observed improvement in functional examination without any concomitant amelioration on OCT after treating LHON patient with rAAV2-ND4 gene therapy [183]. This observation may suggest that improvement of RGC function relies more on functional changes of mitochondria, than on improvement in RNFL and/or microvascular network. Our findings confirm that the peripapillary microvascular network is highly abnormal in eyes manifesting LHON but not in mtDNA mutation carriers. They also support the hypothesis that microangiopathy contributes to the development of MD. Results of SD-OCT-A imaging in LHON patients in this study raise the expectation that the method could be used in diagnosing and monitoring function and apoptosis of RGC.

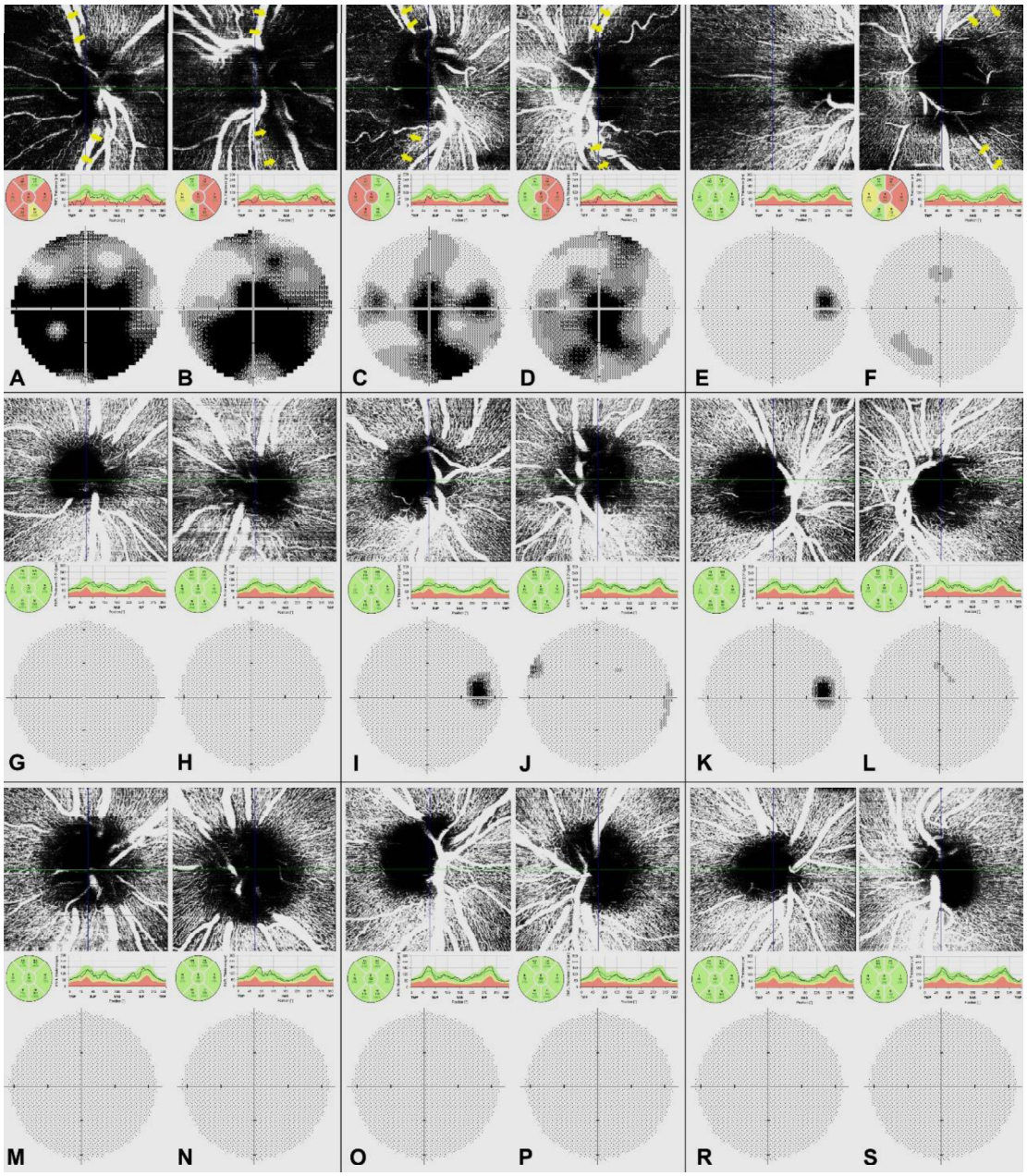


Fig. 26 High resolution reconstruction of the peripapillary vascular network within the Retinal Nerve Fibre Layer (RNFL) in subjects carrying mutations causing Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) and healthy controls. Right and left eye is shown for each individual comprising of an SD-OCT-A image, RNFL measurements plotted against SD-OCT internal normative database (red band pathological values, yellow borderline, green normal thickness) and 22° central visual field established by automated perimetry. In case 1 and 2 with severe LHON there is an apparent bilateral capillary dropout (arrows) corresponding to pathological RNFL temporal thinning and visual field loss **(A-D).** In individual 3 with unilateral LHON presentation 14 months after the onset; right eye scans centred on the papilla could not be obtained due to a delineation error, slight decentring temporally suggests capillary dropout, however it cannot be excluded that this is due to an artefact; RNFL and visual field are normal **(E)**; capillary dropout can be noticed in the affected left eye showing also RNFL thinning and mild visual field defects **(F).** Normal radial peripapillary network, RNFL and visual field in 3 unaffected mtDNA carriers (individuals 4, 5 and 6) **(G-L)** and healthy controls **(M-S).**

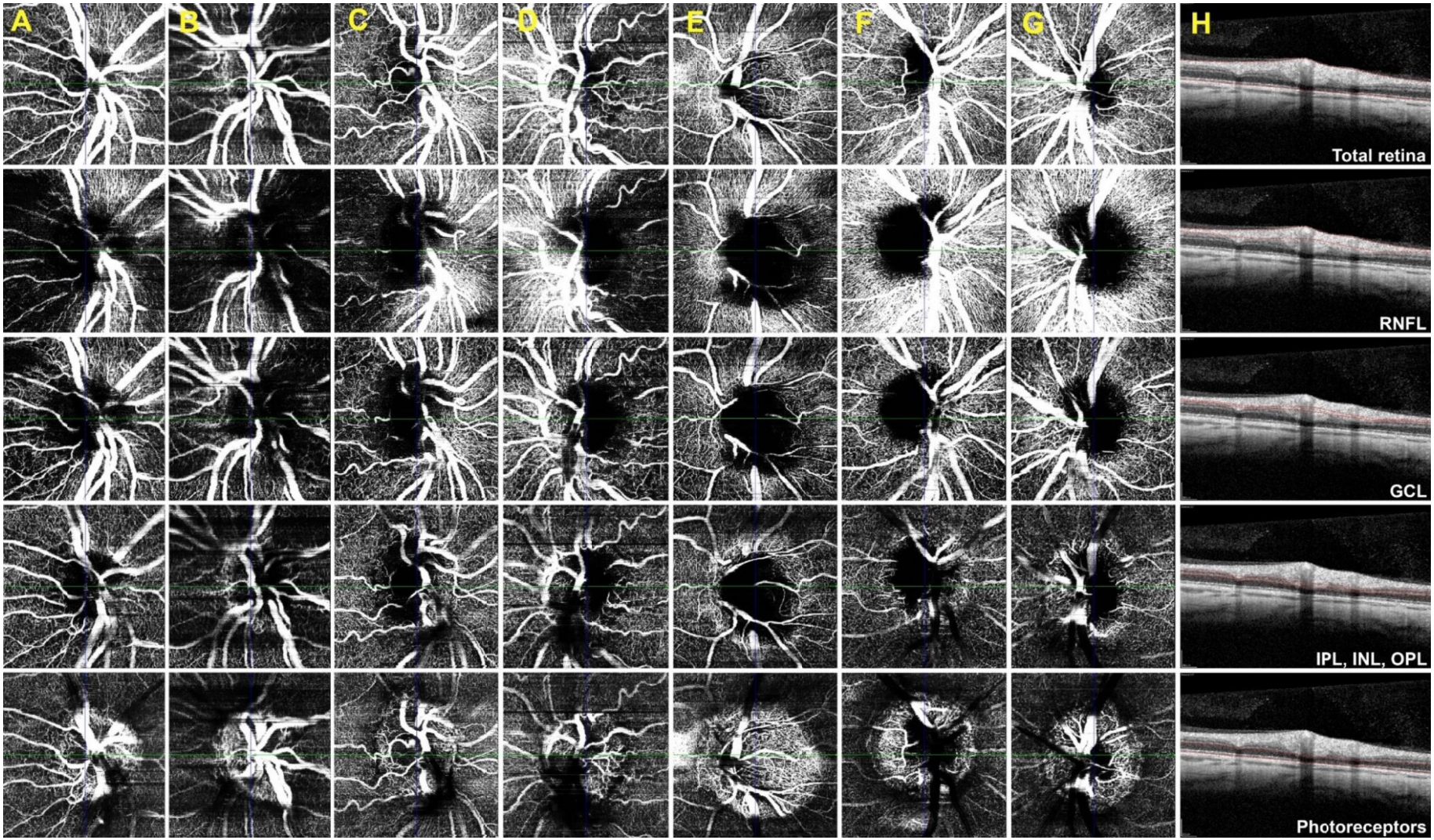


Fig. 27 OCT-A scans showing peripapillary capillary network in various retinal depths in 5 eyes affected by LHON. Right **(A)** and left eye **(B)** of the most severely affected individual 1, right **(C)** and left **(D)** eye of individual 2 and left eye **(E)** of individual 3. Right **(F)** and left **(G)** eye of a control individual. Individual delineation of the studied layers in cross sectional images **(H).** In the most severely affected male there is a marked pathology in all studied layers whereas in affected individual 2 the difference can be noticed in the whole retina (first row), RNFL layer (second row) and GCL (third row). INL, Inner Limiting Membrane; BM, Bruch's Membrane; NFL, Nerve Fibre Layer; GCL, Ganglion Cell Layer; OPL, Outer Plexiform Layer; IPL, Inner Plexiform Layer

4.2.3 Sequence of symptoms in 50 Czech m.3243A>G carriers

The clinical and laboratory data of 50 individuals with MELAS based on m.3243A>G were analysed in a retrospective study. A total of 33 individuals (66 %) were symptomatic patients. Fully expressed phenotype (i.e. with SLE) was observed in 42 % patients, whereas 58 % were oligosymptomatic. The mean age of onset was 17.4±12.9 years. Remarkably, 3 patients presented very early (1 month, 6 months and 2 years, resp.). Similar to [222], all of them had a positive history of early developmental delay, which may represent a risk factor for earlier and more severe presentation of MELAS-specific symptoms. Clinical features of our patients are summarized in Table 5. Overall, 58 % manifested ≥4 symptoms; 4 of our patients remained monosymptomatic up to 12 years of follow-up. The most common presentations were sensorineural hearing loss (76 %), myopathy (56 %) - which was also the most frequent symptom at onset (18 %) - and CPEO (45 %) (Figure 28). The most common 2nd symptom was hearing loss followed by SLE. The median time interval between the 1st and 2nd and the 2nd and 3rd symptoms was 5.0±8.3 (0 - 28) and 2±6.0 years (0-21), respectively. Ophthalmic involvement was observed in 22 patients and was mostly represented by ptosis and/or CPEO. Only in 2 patients, we verified the MON with retinitis pigmentosa. Overall, 11 patients (33 %) died during our follow-up at average age of 32.4±17.7 years (9 - 60) due to MELAS-related reasons. A difference in survival probability was noted between the juvenile (onset <16 years) and the adult groups (p=0.005; Figure 29). In our cohort, muscle enzymes were elevated in 33 % and 50 % of patients during the resting period and metabolic derangement, respectively. Increased lactate levels were more frequently observed in the urine (71 %) than in the blood (62 %) during the resting period, making it a more reliable diagnostic marker. We observed a positive relationship between disease severity and mutant mtDNA levels in some (UEC, hair, blood) but not other (buccal smears, muscle) tissues. Nevertheless, there was a great overlap in the heteroplasmy levels of the asymptomatic and symptomatic patients (Figure 30) and no clear threshold for disease manifestation could be determined. It seems that in MELAS any symptom may come first and stay isolated for a long-time interval. This finding highlights the importance of a lifelong follow-up. Detailed description of the natural course of MELAS may improve the management of patients with MD. Urine appears to be the most suitable sample for both determining lactate levels and m.3243A>G heteroplasmy.

Tab. 5 Clinical features in 33 symptomatic m.3243A>G carriers.

Clinical symptom	Total number of patients	Fully expressed patients	Oligosymptomatic patients
	33	**14**	**19**
	N	N	N
Neurological involvement			
Seizures	14	12	2
Migraines	10	7	3
Stroke-like episodes	14	14	0
Neuropathy	5	2	3
Pseudobulbar syndrome	6	2	4
Cerebellar symptomatology	5	3	2
Myopathy	19	9	10
Hearing			
Sensorineural hearing loss	25	12	13
Ocular involvement			
CPEO	15	8	7
Ptosis	12	6	6
Retrochiasmatic visual loss	5	5	0
Pigmentary retinopathy	2	2	0
Optic neuropathy	2	2	0
Psychiatric disturbances			
Intellectual disability	12	8	4
Depression	7	5	2
Internal organ involvement			
Cardiomyopathy	8	5	3
Wolf-Parkinson-White syndrom	1	1	0
Diabetes mellitus	14	7	7
Thyroid gland disease	6	1	5
Gastrointestinal dysmotility	15	6	9
Others			
Short stature	12	7	5

CPEO, Chronic Progressive External Ophthalmoplegia

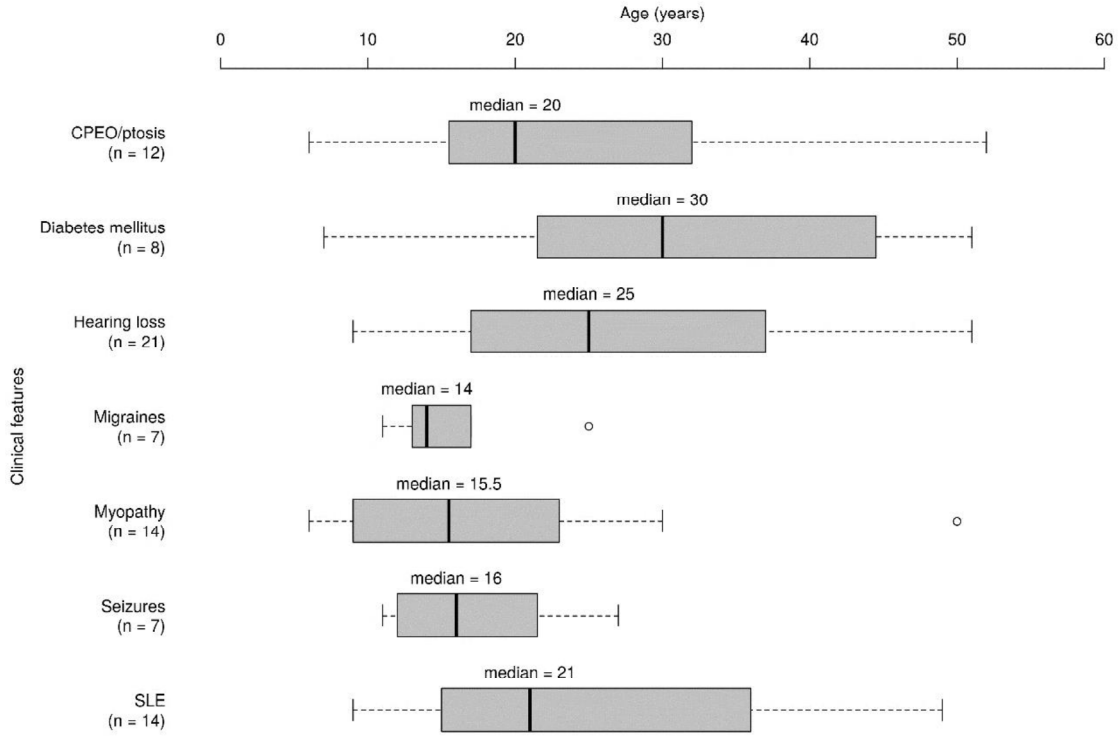


Fig. 28 The sequence of emerging symptoms throughout life span in MELAS patients.
CPEO, Chronic Progressive External Ophthalmoplegia; SLE, Stroke-like Episodes

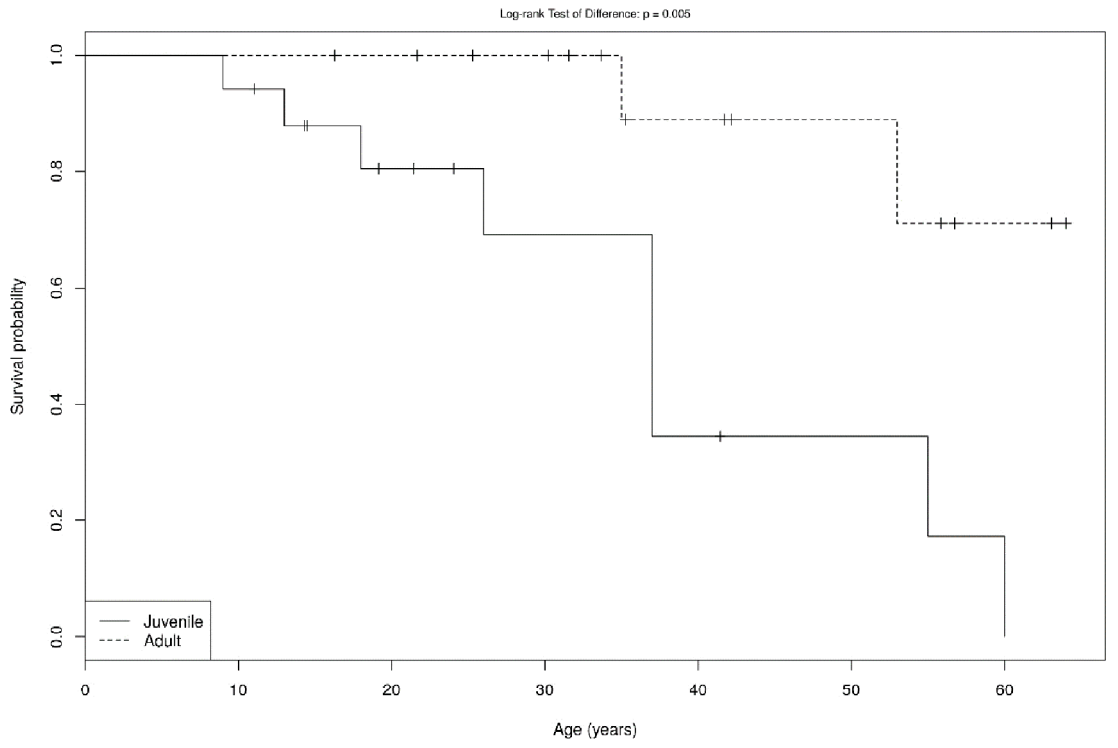


Fig. 29 Difference in survival probability in the juvenile and adult onset MELAS patients.

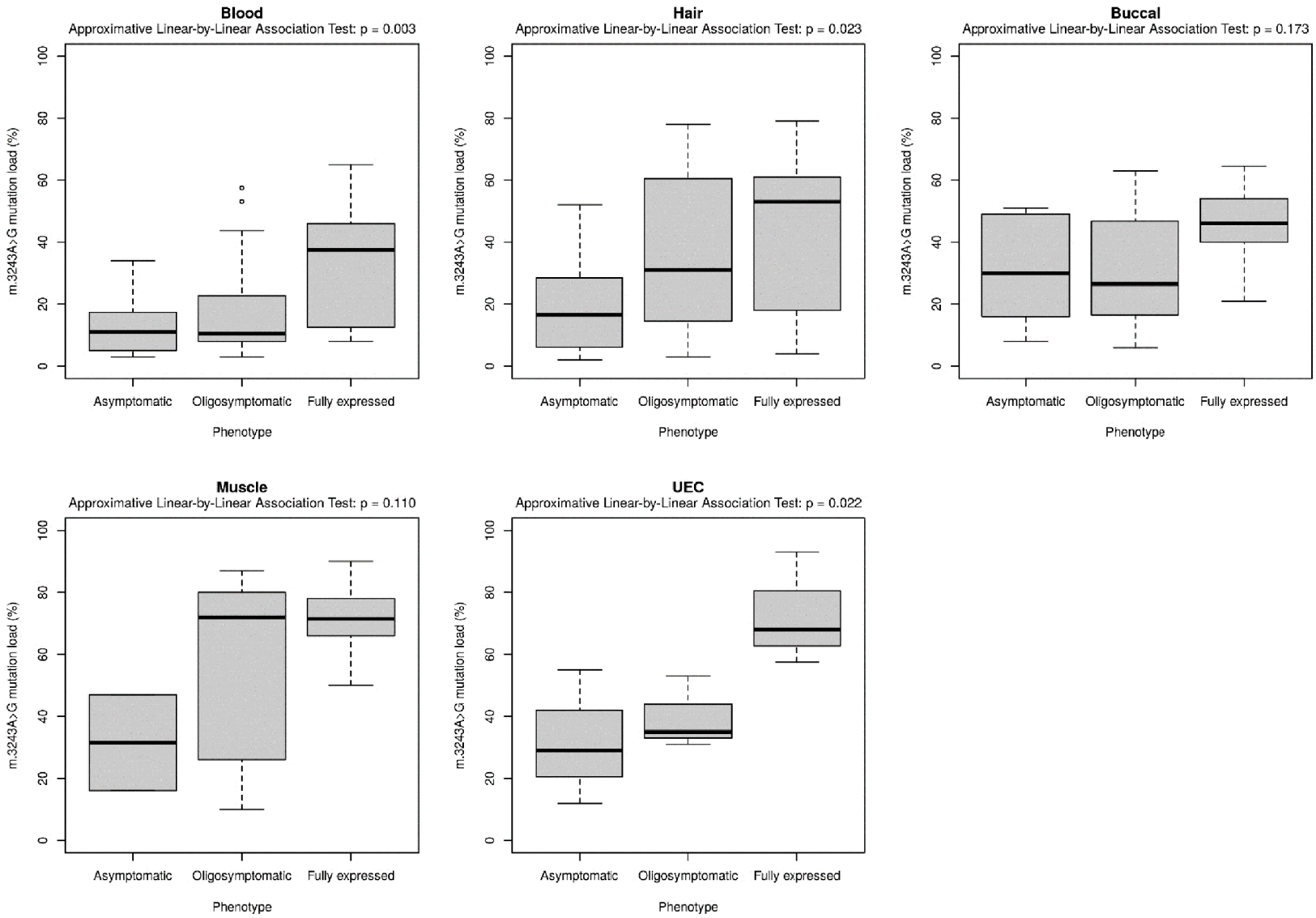


Fig. 30 The m.3243A>G mutation load in various tissues in asymptomatic, oligosymptomatic and fully expressed MELAS patients.
UEC, Urothelial Epithelial Cells.

4.2.4 Unique presentation of LHON/MELAS syndrome based on m.13046T>C

A 12-year-old girl with otherwise unremarkable medical history presented with abrupt, painless loss of vision. Ocular examination confirmed bilateral optic nerve atrophy (Figure 31) with BCVA 0.125 in the right eye and 0.02 in the left eye, two months after the disease onset. Standard automated perimetry revealed severe bilateral visual field loss (Figure 31 C, D) and VEP showed overall reduced amplitudes with prolonged P100 wave latencies. Although this manifestation was very suggestive of LHON syndrome, initial genetic analyses ruled out the most common m.11778G>A/*MT-ND4*, m.14484T>C/*MT-ND6* and m.3460G>A/*MT-ND1*. Moreover, over the next months, the girl developed moderate sensorineural hearing loss (30 dB loss in the right and 20 dB in the left ear), vertigo, migraines, anhedonia and thyroiditis, which are findings frequently associated with oligosymptomatic MELAS. Furthermore, metabolic workup documented elevated CSF lactate of 4.25 mmol/l (normal <2.1) and enzyme histochemistry of muscle biopsy revealed signs of myopathy with focal subsarcolemmal accumulation of SDH product in up to 5 % of muscle fibers and focal weaking of reaction in COX staining. There was a 50 % reduction in the activity of Complex I of the respiratory chain in isolated mitochondria from muscle biopsies, while activities of Complexes II, III and IV were within the control range. MtDNA sequencing revealed a pathogenic heteroplasmic mutation m.13046T>C in the ND5 subunit of complex I (*MT-ND5*), previously described in a single case with a 2-way overlap syndrome MELAS/Leigh [223]. Quantification of heteroplasmy in examined tissue showed the following: UEC 71 %, muscle 70 %, hair follicles 44 %, fibroblasts 40 %, buccal smear 34 % and blood 27 %. Surprisingly, the mutation was not detected in either of these tissues from the patient's asymptomatic mother and two younger brothers. Microangiopathic changes vascular cell loss and blood-brain barrier breakdown could result in multiple ischemic-like lesions occurring in MELAS patients and Leigh syndrome, and similar vascular changes resulting in toxic damage of prelaminar non-myelinated portions of the optic nerve appear in LHON [224]. Thus, the pathogenetic sequences that lead to LHON, MELAS and Leigh syndromes may share a common feature of vascular dysfunction with varying degrees of central nervous system involvement [101]. The present case emphasizes that in cases of vision loss suspected to be due to a disorder of mitochondrial energy metabolism, mutations in other subunits of Complex I must be considered.

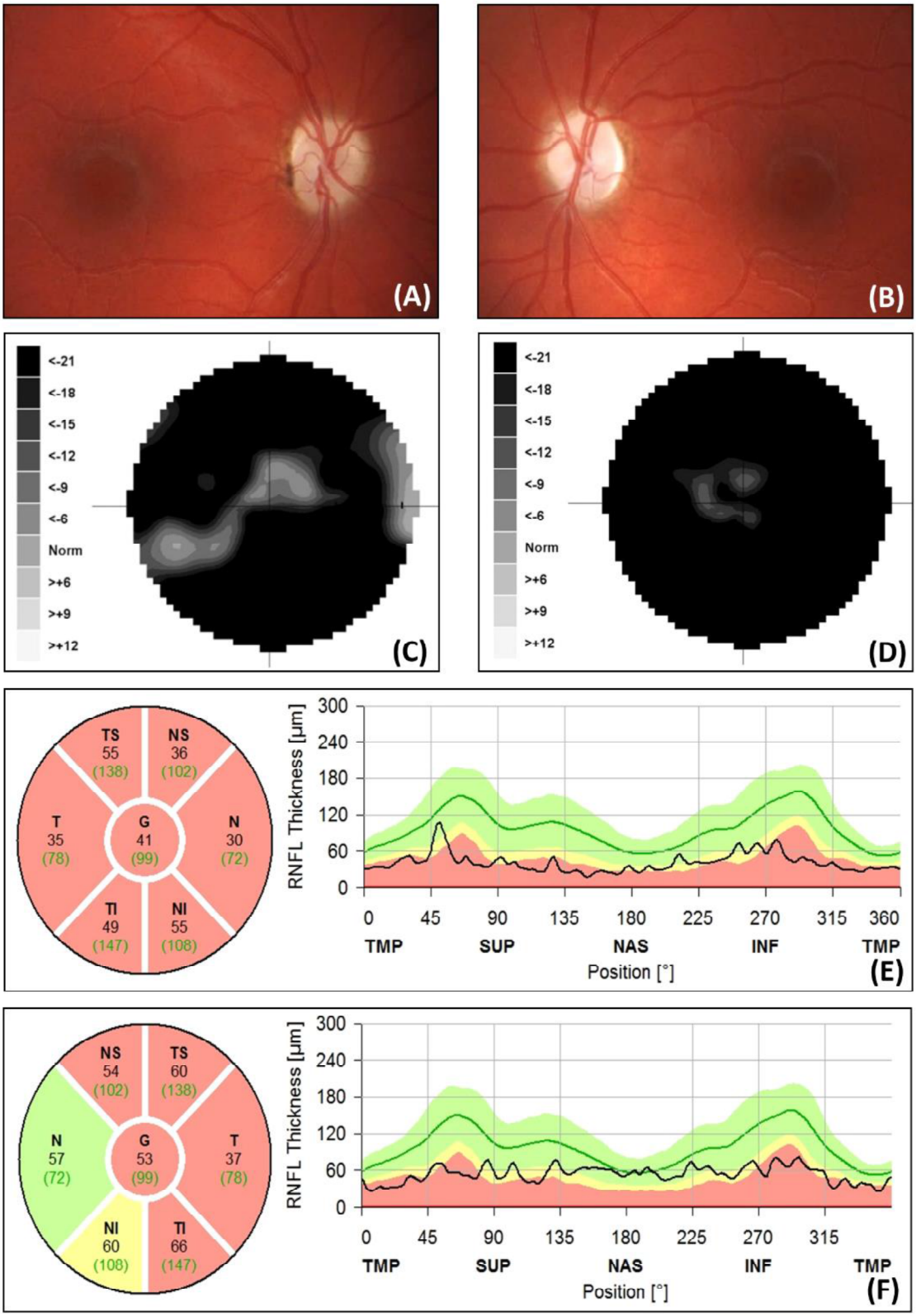


Fig. 31 Fundus photography and autofluorescence imaging: pale optic discs in the right **(A)** and in the left **(B)** eye. **Automated perimetry and retinal nerve fibre layer thickness measurements obtained at the age of 13.5 years**: visual field loss within the central 22°; centrocaecal island extending to the nasal inferior region in the right eye **(C)** and small central island remains in the left eye **(D).** Reduction in retinal nerve fibre layer thickness and loss of striation pattern in the right eye **(E).** Relative preservation of the nasal quadrant in the left eye **(F).**

4.2.5 Molecular genetic analysis of *OPA1* in 44 probands with optic atrophy

A total of 44 probands of British, Canadian and Czech (including 1 Czech Roma) origin referred with the diagnosis of bilateral optic atrophy to the University Hospital of Wales and General University Hospital in Prague were screened by direct sequencing of *OPA1* coding regions and flanking intronic sequences in order to determine the molecular genetic cause of their condition. Clinical referral notes of the patients indicated bilateral impairment of BCVA, pallor of the optic nerve head and evidence of colour vision deficit. Detected rare variants were assessed for pathogenicity by *in silico* analysis. Prior to the start of the study, participating probands were tested negative for the 3 prevalent mutations associated with LHON. A total of 29 heterozygous mutations evaluated as pathogenic were identified in 42 probands; the remaining 2 patients had only variants of unknown significance. A total of 10 novel sequence changes were detected, out of these 7 were considered pathogenic and 3 as variants of unknown significance (Table 6). The great majority (22; 76 %) of the detected pathogenic mutations were predicted to lead to unstable transcripts likely to be degraded by mRNA nonsense mediated decay cell mechanism [177, 225, 226]. Negative family history for DOA was reported by 38 % of probands with pathogenic mutations in *OPA1* which we attribute to *de novo* occurring changes or to incomplete penetrance as in many individuals the phenotype may have a mild expression and remains unnoticed. This is further supported by the fact that 3 of the pathogenic mutations we report were found in the ExAC. In addition, since results of examinations to assess *plus* symptoms were not available for all individuals tested, only 3 probands with the following disease-causing mutations c. 1230+1G>A, c.1367G>A and c.2965dup were documented to suffer from hearing loss and/or neurological impairment. One of the two mutations c.1148A>G in near proximity to intron-exon boundaries (2^{nd} exonic 3' nucleotides), predicted to lead to an amino acid substitution, was found out to cause in-frame skipping of exon 11 (p.Val346_Phe383del) [227]. This case points out the fact that interpretation of mutations needs always to be put into context of nucleotide position within the open reading frame so that variants interfering with splicing process are not wrongly indicated as substitutions. *OPA1* gene screening in patients with bilateral optic atrophy is an important part of clinical evaluation as it may establish correct clinical diagnosis. Our study expands the spectrum of *OPA1* mutations and supports the view that haploinsufficiency is most common disease mechanism in DOA.

Tab. 6 Novel disease-causing *OPA1* variants found in British, Czech and Canadian probands

Proband origin	Family history	Mutation description		mRNA transcript alteration	Position at chromosome 3	Mutation classification
		DNA	Protein Domain (missense mutations)			
B	Y	c.678+1G>T	p.?	Splicing	3:193336726	Pathogenic
CZ	N	c.943C>T	p.(Leu315Phe) Downstream from coiled coil 1	Missense	3:193353306	Unknown significance
B	N	c.949-1G>C	p.?	Splicing	3:193354981	Pathogenic
B	N	c.949-2A>G	p.?	Splicing	3:193354982	Pathogenic
B	N	c.1805C>A	p.(Ala602Glu) Dynamin, GTPase domain	Missense	3:193364904	Pathogenic
C	Y	c.2355G>C**	p.(Leu785Phe) Middle domain	Missense	3:193376699	Unknown significance
B	Y	c.1989del	p.(Ser664Alafs*24)	Frameshift	3:193366637	Pathogenic
B	Y	c.2102del	p.(Ser701*)	Nonsense	3:193372740	Pathogenic
B	N	c.2858_2865dup	p.(Thr956Leufs*9)	Frameshift	3:193384172	Pathogenic
CZ	Y	c.2965dup	p.(Gln989Profs*10)	Frameshift	3:193385052	Pathogenic

Chromosomal position relates to GRCh37/hg19 assembly of the human genome. NM_130837.2 was used as the reference sequence. Chromosomal position corresponds to the human genome build GRCh37/hg19 and in case of a deletion or duplication of multiple nucleotides the position of the first nucleotide is indicated. B, British; C, Canadian; CZ, Czech; Y, Yes; N, No; ExAC, Exome Aggregation Consortium.

4.2.6 MON – optimization of centered care

Recent advances in therapeutic management of MON patients are very promising and highlight the importance of early diagnosis. Nevertheless, incomplete penetrance, in addition to variable clinical manifestation, causes substantial differential diagnostic difficulties and often leads to therapeutic delay. The main focus of this Thesis was therefore the application of our results and experiences in clinical practice. In 2013, we succeeded in creating a ***National Center for Patients with Mitochondrial Optic Neuropathies*** in order to bring the best care to patients with rare mitochondrial optic diseases, improve diagnostic tools and harmonize clinical and preclinical research (Figure 32) [112]. In 2016, the Ophthalmology and Pediatrics Departments and the Institute of Inherited Metabolic disorders joined, as the only institutions of such specialization, the ERN-Eye and Metab-ERN. One of the main goal of this European initiative is to provide high-quality and cost-effective care in conditions requiring a concentration of resources or expertise, and even more so with rare or low-prevalence complex diseases. In 2017, we become members of the National Board of LHON Experts.

In our Laboratory for study of Mitochondrial Disorders there were 160 and 17 genetically confirmed LHON and DOA patients, respectively, but before the creation of our Center, only a handful of them benefitted from the regular follow-up care. The average diagnostic delay of MON was more than 12 months - a time when the irreversible tissue damage of the optic nerve already occurs. Since 2013, we managed to examine a group of 54 patients with LHON, 17 patients with DOA and 10 patients with unknown cause of MON. Thanks to the early diagnosis in our Center, we were able to initiate therapy with coenzyme Q analogue (idebenone) in 8 symptomatic (5 LHON, 2 DOA, 1 LHON/MELAS overlap syndrome) and 3 patients with subclinical signs of the disease in a period of 4 weeks - 9 months after the disease onset. This treatment has led to significant amelioration of visual impairment in 4 patients. Two probands were included in phase III clinical trial of gene therapy in Munich (RESCUE Study, GenSight Biologics, Paris; Study No: GS-LHON-CLIN-03A), and are, therefore, the first Czech patients approved for this kind of treatment.

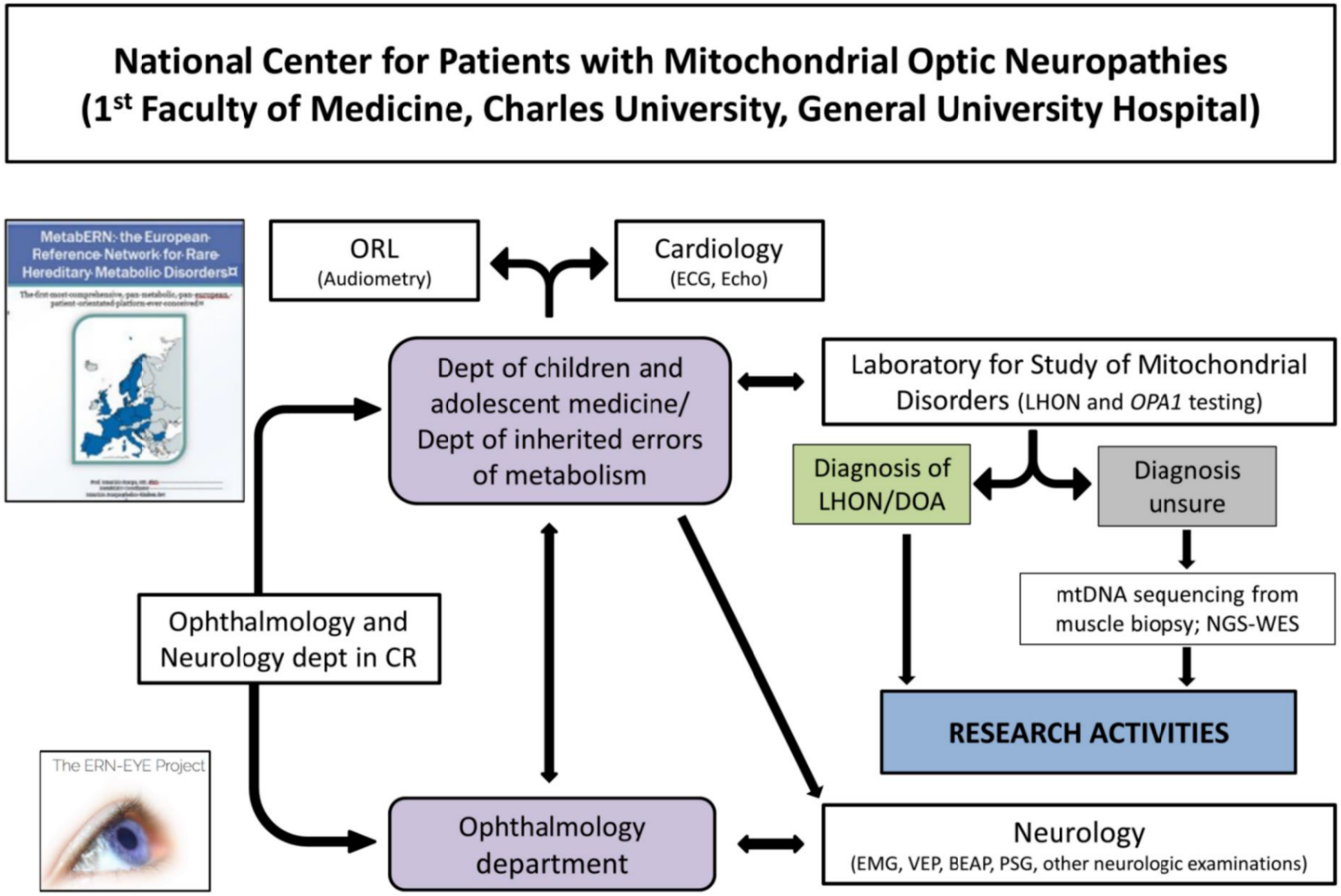


Fig. 32 Schematic representation of General University Hospital and First Faculty of Medicine at Charles University with its interconnected departments involved in the care of patients with mitochondrial optic neuropathies. The Center for Patients with Mitochondrial Optic neuropathies is a member of European Reference Network for Rare Eye Diseases (ERN-Eye).

4.2.7 Ocular gene therapies in patients with inherited retinal disorders

Thanks to the advent of genetic engineering, gene-based therapies are currently being developed for a growing list of diseases. Because of relatively easy accessibility and visualization allowing monitoring efficacy, retina turns out to be a convenient compartment with tremendous treatment potential. Most gene-therapy vectors used in the eye are based on adeno-associated virus, retrovirus or lentivirus. At present, gene-based clinical trials have been registered for several monogenic retinal disorders: Leber Congenital Amaurosis 2 (LCA2), retinitis pigmentosa 38, Usher syndrome 1B, Stargardt disease, choroideremia, achromatopsia, X-linked retinoschisis and LHON. Apart from *RPE65* gene therapy for LCA2 and *MT-ND4* for LHON which has reached phase III, all other trials are in investigation phase I and II, i.e. testing the efficacy and safety. Since the damage to the retina sets in quickly, time window for therapeutic intervention is very short.

None of the dozens of gene therapy studies are currently underway in the Czech Republic. This is especially due to the absence of proper legislation in our country which prevents our institutions to be involved in international multicenter clinical gene therapy trials. However, due to the prompt diagnosis in our center of two male patients with m.11778G>A LHON prevalent mutation, we managed to enter phase III trial with gene therapy GS010 proceeding in Munich. The first study conducted by the group of Wan showed promising results of GS010 with significant ameliorations in visual acuity and visual field as was already mentioned above [183]. Our two patients are the first Czech patient not only receiving intravitreal GS010, but treated by gene therapy at all.

With the development of novel therapeutic approaches, establishing not only clinical but also molecular genetic diagnosis is of crucial importance. Although very appealing, gene therapy still concerns an experimental therapeutic approach, yet only available by clinical trials. Nevertheless, recent rapid advances in this field have allowed us to hope that gene therapy will be a causal treatment not only for devastating retinal disorders within the next few years.

THE MAIN POINTS RELATED TO AIM B)

I) Due to the high incidence of extraocular symptoms, especially in LHON female patients, we emphasized the need for their search and management even in subclinical or asymptomatic cases.

II) In our cohort study of 50 Czech m.3243A>G mutation carriers, we described for the first time the sequence of emerging symptoms of MELAS syndrome including its ophthalmic manifestation.

III) Very rare mutation m.13046T>C was revealed in a unique phenotype of LHON/MELAS overlap syndrome.

IV) Our patients with DOA were included in the international project that expanded the spectrum of *OPA1* mutations and supported the fact, that haploinsufficiency is the most common disease mechanism.

V) We succeeded in creating a *National Center for Patients with Mitochondrial Optic Neuropathies* in order to optimize diagnostic, therapeutic, as well as research strategies. In 2016, our Center joined the ERN-Eye and the author of this Thesis and her co-workers become members of the National Board of LHON Experts. With this project, the author won a 1st place of the Albert Schweitzer Prize for Medicine in 2017.

VI) Centralized care management significantly improves quality of life in families affected by mitochondrial optic neuropathies. Thanks to the early diagnosis in our Center, we were able to initiate therapy with idebenone and intravitreal GS010 in 11 and 2 patients, respectively. The latter are the first Czech patients approved for gene therapy.

4.3 Results and discussion related to the aim C)

Pathobiochemical and molecular aspects of selected rare inherited errors of metabolism

Supplement 12] ***Kolarova, H.**, Tesarova, M., Svecova, S., Stranecky, V., Pristoupilova, A., Zima, T., Uhrova, J., Volgina, S.Y., Zeman, J., Honzik, T. (2014)* ***Lipoprotein lipase deficiency: clinical, biochemical and molecular characteristics in three patients with novel mutations in the LPL gene.*** *Folia Biol 60(5), 235-43. IF 1.0*

Supplement 13] *Ondruskova, N., Honzik, T.,* ***Kolarova, H.**, Pakanova, Z., Mucha, J., Zeman, J., Hansikova, H.* ***Aberrant ApoC-III glycosylation in glycogen storage diseases Type III and IX.*** *Metab Clin Exp. (submitted)*

Supplement 14] ***Kolářová, H.**, Honzík, T., Zeman, J. Poruchy cykly močoviny; Fenylketonurie; Glykogenóza typ Ia (Von Gierkeho nemoc); Glykogenóza typ non-Ia; Glykogenóza typ III (Coriho nemoc, Forbesova nemoc); Leberova hereditární optická neuropatie (LHON snydrom); Deficit lysosomální kyselé lipázy; Deficit lipoproteinové lipázy; Hypofosfatázie; MELAS.* **In** ***Dědičné poruchy metabolismu v kazuistikách*** *(2016), Mladá fronta a. s., Praha, ISBN 978-80-204-4187-4*

Author's contribution: clinical examination of patients (12, 13, 14), collection of laboratory and clinical data (12, 13, 14) and manuscript preparation (12, 14)

4.3.1 Characterization of three patients with LPL Deficiency

First two Czech and one Russian patient with LPL deficiency are described. Patient 1 presented since the 1st week of life with recurrent abdominal pain; Patient 3 with abdominal distension and hepatosplenomegaly since the 2nd month of life. Patient 2, asymptomatic younger brother of Patient 1, was diagnosed in the 1st week of life. Lipaemia retinalis and splenomegaly were present in two children, hepatomegaly in Patient 3 and acute pancreatitis in Patient 1. Interestingly, in our patient siblings, enlargement of kidneys was also found, which, to our best knowledge, has not been described so far. All children had lactescent serum (Figure 33 A), profound HTG (124 ± 25 mmol/l; controls < 2.2), hypercholesterolaemia (22.8 ± 7.3 mmol/l, controls < 4.2) and low HDL-cholesterol level (0.42±0.02 mmol/l) that persisted even after long-term diet. Their serum LPL mass did not increase after heparin injection (6.3, 5.6 and 4.6 ng/l, respectively; (Figure 33 B). Both siblings were homozygous for a novel c.476C>G (p.Ser159Th) and c.1421C>G (p.Ser474Term). Patient 3 was compound heterozygous for novel c.604G>A (p.Asp202Asn) and c.698A>G (p.Tyr233Cys) in the *LPL*, respectively. There were no polymorphisms in the *LPL*, *APOC2*, *APOE*, *APOA5* or *GPIHBP1* that could explain the HTG in the Patient 1 and 2 mother's side family. A low-fat diet with 0.5-0.6 g of fat/day, introduced in all patients has led to normalization of lipid profile and clinical symptoms. We emphasize the need for considering LPL deficiency in neonates and young infants with abdominal pain and HTG as early treatment may prevent development of life-threating pancreatitis.

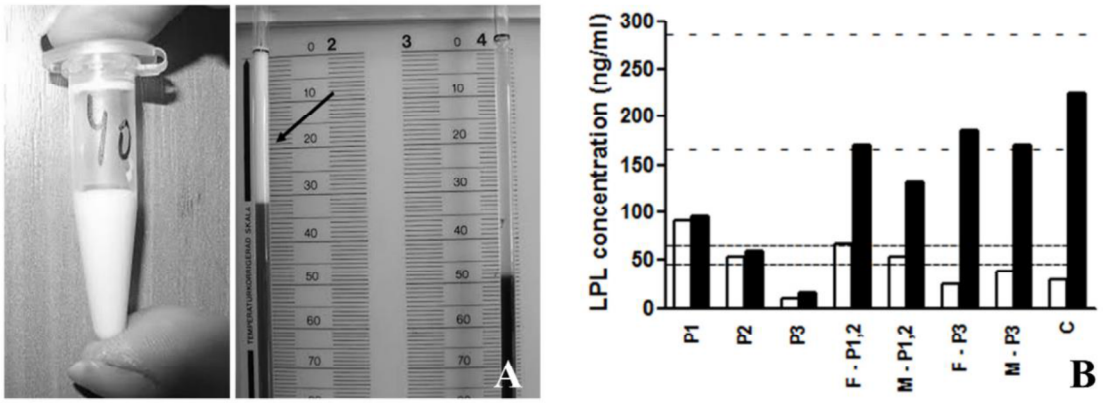


Fig. 33 Milky-cream, lipaemic appearance of the serum in P1 with HTG of 93 mmol/l (A). LPL immunoreactive mass in pre-heparin (□) and post-heparin (■) serum in three children with LPL deficiency (P1, P2, P3) compared to their parents (B). The reference range interval for pre-heparin plasma LPL mass ------ is 45-63 ng/ml, for the post-heparin plasma - - - - 164-284 ng/ml. F - P1,2, Father of P1 and 2; M – P 1,2, Mother of P1 and 2; F - P3, Father of Patient 3; M - P3, Mother of P3; C, Healthy Control; P, Patient.

4.3.2 Aberrant ApoC-III glycosylation in GSD

It is increasingly evident that secondary glycosylaton abnormalities might occur in other, non-Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) metabolic diseases. The aim of this study was to examine N-/O-glycosylation in our group of 24 patients with various types of GSD (types 0, Ia, non-Ia, III and IX) in order to determine whether there is a broader biochemical overlap between the CDG and GSD syndromes. TF N-glycosylation was found to be normal in the majority of the analyzed samples. While the sialylation of ApoC-III in GSD types 0, Ia and non-Ia was rather variable and overall borderline, in the patients with GSD types III and IX it was found to be consistently markedly reduced (p=0.0004). A notable elevation of the aglycosylated form of ApoC-III with absolutely unoccupied glycosylation site was found by subsequent analyses using SDS-PAGE and MALDI-TOF MS, predominantly in patients with GSD types III and IX. A representative profile from both IEF and MS analysis in a selected sample from one GSD III patient is given in (Figure 34 A, B). The ApoC-III glycosylation profile became more pathological in a period of non-compliance with frequent hypoglycaemias and the status of ApoC-III sialylation perhaps reflects metabolic (de)compensation in these patients. Considering the unavailability of enzymatic assay for GSD type III or certain unreliability of this investigation in GSD type IX, our finding could help clinicians better target and select appropriate genetic analysis for the diagnostic confirmation. We also hypothesize that ApoC-III hypoglycosylation in these disorders results from reduced availability of the nucleotide-monosaccharides, specifically UDP-GalNAc, in the corresponding glycosylation reactions.

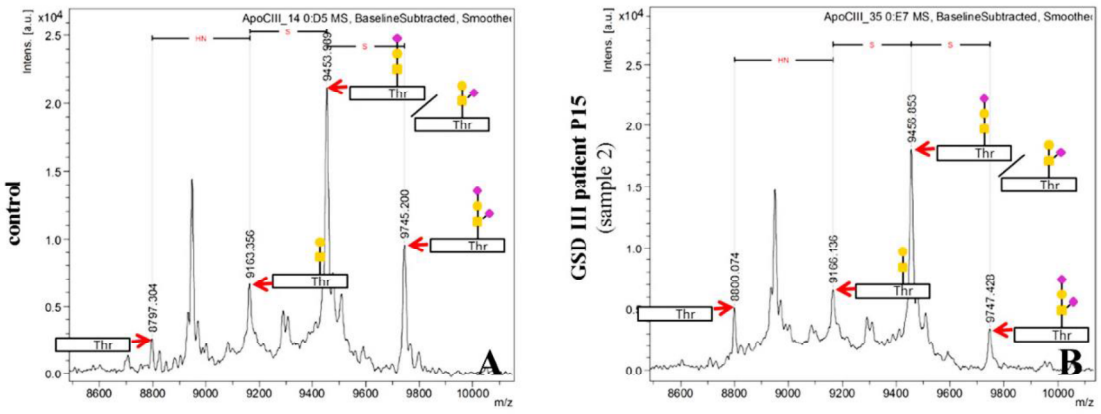


Fig. 34 One selected sample from GSD type III patient (P15) analyzed by isoelectric focusing using PhastSystem Electrophoresis System (GE Healthcare) **(A)** and **mass spectrometry** on UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) **(B).**

THE MAIN POINTS RELATED TO AIM C)

I) We described clinical, biochemical and molecular characteristics of first two patients of Czech origin and one patient of Russian origin with LPL deficiency. A novel c.476C>G mutation in the *LPL* was found and disease-related kidney enlargement in our patient siblings is suggested to be a novel presentation of this a rare disorder of lipid metabolism.

II) Novel finding of markedly hypoglycosylated ApoC-III in patients with GSD types III and IX could be helpful for clinicians in cases of suspected patients, in whom the clinical picture strongly suggests a particular type of GSD, but the corresponding enzymatic assays are within the normal range.

5 CONCLUSION

Inborn errors of metabolism, represent a heterogenous group of conditions, most having an incidence of less than 1 in 100,000 births. Because of their low prevalence, they are on the margin of attention of general research and even more so of large pharmaceutical companies. If there is an existing therapy, it is often high prized, which makes it hardly accessible. In addition, due to their non-specific presentation, rare diseases are often underscored by the physicians of first contact which causes severe diagnostic delay. Studying clinical, biochemical and molecular aspects of rare diseases is the only way to design therapeutic options in order to improve quality of life of affected patients. Of special importance is the multidisciplinary approach and international cooperation in this field of medical research.

In conclusion, the proposed aims of the Thesis were accomplished. Present work contributed to better understanding of mitochondrial biogenesis within the foetal development as well as adult life. Secondly, we have managed to characterize the biochemical and molecular–genetic background in more than 200 patients, and both selected cases and cohort studies were published, bringing novel phenotype and genotype findings. Finally, the main contribution of this Thesis was the application of our results and experience in clinical practice. Our results bring evidence that centralized care management significantly improves quality of life in families affected by MON.

6 REFERENCES

1. Chinnery, P.F., Hudson, G. (2013). Mitochondrial genetics. Br Med Bull *106*, 135-159.
2. Schaefer, A.M., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F. (2004). The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. Biochim Biophys Acta *1659*, 115-120.
3. Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. Science (New York, N.Y.) *283*, 1482-1488.
4. Zeviani, M., Di Donato, S. (2004). Mitochondrial disorders. Brain *127*, 2153-2172.
5. Chi, C.S. (2015). Diagnostic approach in infants and children with mitochondrial diseases. Pediatr Neonatol *56*, 7-18.
6. Pedram, A., Razandi, M., Wallace, D.C., Levin, E.R. (2006). Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. Mol Biol Cell *17*, 2125-2137.
7. Wirth, C., Brandt, U., Hunte, C., Zickermann, V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. Biochim Biophys Acta *1857*, 902-914.
8. Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H.J., Arnold, S., Brandt, U., Nijtmans, L. (2017). The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. Cell Metabol *25*, 128-139.
9. McFarland, R., Kirby, D.M., Fowler, K.J., Ohtake, A., Ryan, M.T., Amor, D.J., Fletcher, J.M., Dixon, J.W., Collins, F.A., Turnbull, D.M., et al. (2004). De novo mutations in the mitochondrial ND3 gene as a cause of infantile mitochondrial encephalopathy and complex I deficiency. Ann Neurol *55*, 58-64.
10. Kirby, D.M., Salemi, R., Sugiana, C., Ohtake, A., Parry, L., Bell, K.M., Kirk, E.P., Boneh, A., Taylor, R.W., Dahl, H.H., et al. (2004). NDUFS6 mutations are a novel cause of lethal neonatal mitochondrial complex I deficiency. J Clin Invest *114*, 837-845.
11. Pitkanen, S., Feigenbaum, A., Laframboise, R., Robinson, B.H. (1996). NADH-coenzyme Q reductase (complex I) deficiency: heterogeneity in phenotype and biochemical findings. J Inherit Metab Dis *19*, 675-686.
12. Robinson, B.H. (1998). Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. Biochim Biophys Acta *1364*, 271-286.

13. Loeffen, J.L., Smeitink, J.A., Trijbels, J.M., Janssen, A.J., Triepels, R.H., Sengers, R.C., van den Heuvel, L.P. (2000). Isolated complex I deficiency in children: clini-cal, biochemical and genetic aspects. Hum Mutat *15*, 123-134.
14. Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu Rev Biochem *54*, 1015-1069.
15. Carr, H.S., George, G.N., Winge, D.R. (2002). Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. J Biol Chem *277*, 31237-31242.
16. Rohdich, F., Kadenbach, B. (1993). Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase efficiency by nucleotides. Biochemistry *32*, 8499-8503.
17. Bonne, G., Seibel, P., Possekel, S., Marsac, C., Kadenbach, B. (1993). Expression of human cytochrome c oxidase subunits during fetal development. Eur J Biochem / FEBS *217*, 1099-1107.
18. Shoubridge, E.A. (2001). Cytochrome c oxidase deficiency. Am J Med Genet *106*, 46-52.
19. Houštěk, J., Pícková, A., Vojtíšková, A., Mráček, T., Pecina, P., Ješina, P. (2006). Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. Biochim Biophys Acta, Bioenergetics *1757*, 1400-1405.
20. Tuppen, H.A., Blakely, E.L., Turnbull, D.M., Taylor, R.W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. Biochim Biophys Acta *1797*, 113-128.
21. Wallace, D.C. (2011). Bioenergetic origins of complexity and disease. Cold Spring Harb Symp Q Biol *76*, 1-16.
22. Moraes, C.T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A.F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L.C., Servidei, S., et al. (1989). Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Medicine *320*, 1293-1299.
23. Zhou, Q., Li, H., Li, H., Nakagawa, A., Lin, J.L., Lee, E.S., Harry, B.L., Skeen-Gaar, R.R., Suehiro, Y., William, D., et al. (2016). Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. Science (New York, N.Y.) *353*, 394-399.
24. Schwartz, M., Vissing, J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. The N Engl J Medicine *347*, 576-580.
25. Shadel, G.S., Clayton, D.A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. Annu Rev Biochem *66*, 409-435.

26. Brown, T.A., Cecconi, C., Tkachuk, A.N., Bustamante, C., Clayton, D.A. (2005). Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. Genes Dev *19*, 2466-2476.
27. Cotney, J., Wang, Z., Shadel, G.S. (2007). Relative abundance of the human mitochondrial transcription system and distinct roles for h-mtTFB1 and h-mtTFB2 in mitochondrial biogenesis and gene expression. Nucleic Acids Res *35*, 4042-4054.
28. Ma, J., Farwell, M.A., Burkhart, W.A., Spremulli, L.L. (1995). Cloning and sequence analysis of the cDNA for bovine mitochondrial translational initiation factor 2. Biochim Biophys Acta *1261*, 321-324.
29. Koc, E.C., Spremulli, L.L. (2002). Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. J Biol Chem *277*, 35541-35549.
30. Zhang, Y., Spremulli, L.L. (1998). Identification and cloning of human mitochon-drial translational release factor 1 and the ribosome recycling factor. Biochim Bio-phys Acta *1443*, 245-250.
31. Izquierdo, J.M., Ricart, J., Ostronoff, L.K., Egea, G., Cuezva, J.M. (1995). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. J Biol Chem *270*, 10342-10350.
32. Dominy, J.E., Puigserver, P. (2013). Mitochondrial biogenesis through activation of nuclear signaling proteins. Cold Spring Harb Persp Biol *5*.
33. Psarra, A.-M.G., Sekeris, C.E. (2009). Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. Biochim Biophys Acta, Bioenergetics *1787*, 431-436.
34. Harper, M.E., Seifert, E.L. (2008). Thyroid hormone effects on mitochondrial energetics. Thyroid *18*, 145-156.
35. Giguere, V. (2008). Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. Endocr Rev *29*, 677-696.
36. Valcarce, C., Izquierdo, J.M., Chamorro, M., Cuezva, J.M. (1994). Mammalian adaptation to extrauterine environment: mitochondrial functional impairment caused by prematurity. Biochem J *303 (Pt 3)*, 855-862.
37. Piko, L., Taylor, K.D. (1987). Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. Dev Biol *123*, 364-374.
38. Shoubridge, E.A., Wai, T. (2007). Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. Curr Top Dev Biol *77*, 87-111.

39. Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., Jauniaux, E. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. Obstet Gynecol *80*, 283-285.

40. Jauniaux, E., Watson, A.L., Hempstock, J., Bao, Y.P., Skepper, J.N., Burton, G.J. (2000). Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. Am J Pathol *157*, 2111-2122.

41. Mackler, B., Grace, R., Duncan, H.M. (1971). Studies of mitochondrial development during embryogenesis in the rat. Arch Biochem Biophys *144*, 603-610.

42. Sako, Y. (1975). Ultrastructure of the cardiac muscle of early human embryo. Jpn Circ J *39*, 1123-1133.

43. Wenchich, L., Zeman, J., Hansikova, H., Plavka, R., Sperl, W., Houstek, J. (2002). Mitochondrial energy metabolism in very premature neonates. Biol Neonate *81*, 229-235.

44. Honzik, T., Wenchich, L., Bohm, M., Hansikova, H., Pejznochova, M., Zapadlo, M., Plavka, R., Zeman, J. (2008). Activities of respiratory chain complexes and pyruvate dehydrogenase in isolated muscle mitochondria in premature neonates. Early Hum Dev *84*, 269-276.

45. Honzik, T., Tesarova, M., Magner, M., Mayr, J., Jesina, P., Vesela, K., Wenchich, L., Szentivanyi, K., Hansikova, H., Sperl, W., 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*, 749-759.

46. Ogawa, M., Matsuda, Y., Kanda, E., Konno, J., Mitani, M., Makino, Y., Matsui, H. (2013). Survival rate of extremely low birth weight infants and its risk factors: case-control study in Japan. ISRN Obstet Gynec *2013*, 873563.

47. Mrhalkova, A. (2010). Study of expression and maturation of mitochondrial oxida-tive phosphorylation system during mammal's prenatal period. In Přírodovědecká fa-kulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. (Praha: Univerzita Karlova v Praze).

48. Ostronoff, L.K., Izquierdo, J.M., Enriquez, J.A., Montoya, J., Cuezva, J.M. (1996). Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. Biochem J *316 (Pt 1)*, 183-191.

49. Cuezva, J.M., Ostronoff, L.K., Ricart, J., Lopez de Heredia, M., Di Liegro, C.M., Izquierdo, J.M. (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. J Bioenerg Biomem *29*, 365-377.

50. Oey, N.A., den Boer, M.E., Wijburg, F.A., Vekemans, M., Auge, J., Steiner, C., Wanders, R.J., Waterham, H.R., Ruiter, J.P., Attie-Bitach, T. (2005). Long-chain fatty acid oxidation during early human development. Pediatr Res *57*, 755-759.
51. Dubowitz, V. (1966). Enzyme histochemistry of developing human muscle. Nature *211*, 884-885.
52. Collardeau-Frachon, S., Scoazec, J.Y. (2008). Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. Anat Rec (Hoboken, N.J.: 2007) *291*, 614-627.
53. Moore, M.A., Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. Br J Haematol *18*, 279-296.
54. Minot, C.S. (1912). Development of the blood, the vascular system and the spleen. (Philadelphia: J.B. Lippincott Co., The Washington Square Press).
55. Zamboni, L. (1965). Electron microscopic studies of blood embryogenesis in hu-mans. II. The hemopoietic activity in the fetal liver. J Ultrastruct Res *12*, 525-541.
56. Brugnara, C., Platt, O.S. (2003). The neonatal erythrocyte and its disorders. 6th Edition, (Saunders).
57. Magner, M., Kolarova, H., Honzik, T., Svandova, I., Zeman, J. (2015). Clinical manifestation of mitochondrial diseases. Developmental period medicine *19*, 441-449.
58. Feichtinger, R.G., Sperl, W., Bauer, J.W., Kofler, B. (2014). Mitochondrial dysfunction: a neglected component of skin diseases. Exp Dermatol *23*, 607-614.
59. Mazurova, S., Tesarova, M., Magner, M., Houstkova, H., Hansikova, H., Augustinova, J., Tomek, V., Vondrackova, A., Zeman, J., Honzik, T. (2013). Novel mutations in the TAZ gene in patients with Barth syndrome. Prague Med Rep *114*, 139-153.
60. Magner, M., Dvorakova, V., Tesarova, M., Mazurova, S., Hansikova, H., Zahorec, M., Brennerova, K., Bzduch, V., Spiegel, R., Horovitz, Y., et al. (2015). TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. J Inherit Metab Dis *38*, 417-426.
61. Magner, M., Vinsova, K., Tesarova, M., Hajkova, Z., Hansikova, H., Wenchich, L., Jesina, P., Smolka, V., Adam, T., Vaneckova, M., et al. (2011). Two patients with clinically distinct manifestation of pyruvate dehydrogenase deficiency due to mutations in PDHA1 gene. Prague Med Rep *112*, 18-28.
62. Wenchich, L., Drahota, Z., Honzik, T., Hansikova, H., Tesarova, M., Zeman, J., Houstek, J. (2003). Polarographic evaluation of mitochondrial enzymes activity in

isolated mitochondria and in permeabilized human muscle cells with inherited mitochondrial defects. Physiol Res *52*, 781-788.

63. Pecina, P., Houstkova, H., Mracek, T., Pecinova, A., Nuskova, H., Tesarova, M., Hansikova, H., Janota, J., Zeman, J., Houstek, J. (2014). Noninvasive diagnostics of mitochondrial disorders in isolated lymphocytes with high resolution respirometry. BBA Clin *2*, 62-71.
64. Tesarova, M., Hansikova, H., Hlavata, A., Klement, P., Houst'kova, H., Houstek, J., Zeman, J. (2002). [Variation in manifestations of heteroplasmic mtDNA mutation 8993 T>G in two families]. Cas lek cesk *141*, 551-554.
65. Honzik, T., Tesarova, M., Vinsova, K., Hansikova, H., Magner, M., Kratochvilova, H., Zamecnik, J., Zeman, J., Jesina, P. (2013). Different laboratory and muscle biopsy findings in a family with an m.8851T>C mutation in the mitochondrial MTATP6 gene. Mol Genet Metab *108*, 102-105.
66. Dvorakova, V., Magner, M., Honzik, T. (2015). Hyperammonemic crisis in a child with ATP synthase deficiency caused by mtDNA mutation m.8851T>C. Mol Genet Metabol Rep *2*, 46.
67. Fornuskova, D., Brantova, O., Tesarova, M., Stiburek, L., Honzik, T., Wenchich, L., Tietzeova, E., Hansikova, H., Zeman, J. (2008). The impact of mitochondrial tRNA mutations on the amount of ATP synthase differs in the brain compared to other tissues. Biochim Biophys Acta *1782*, 317-325.
68. Bohm, M., Pronicka, E., Karczmarewicz, E., Pronicki, M., Piekutowska-Abramczuk, D., Sykut-Cegielska, J., Mierzewska, H., Hansikova, H., Vesela, K., Tesarova, M., et al. (2006). Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. Pediatr Res *59*, 21-26.
69. Honzik, T., Tesarova, M., Mayr, J.A., Hansikova, H., Jesina, P., Bodamer, O., Koch, J., Magner, M., Freisinger, P., Huemer, M., et al. (2010). Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. Arch Dis Child *95*, 296-301.
70. Vondrackova, A., Vesela, K., Kratochvilova, H., Kucerova Vidrova, V., Vinsova, K., Stranecky, V., Honzik, T., Hansikova, H., Zeman, J., Tesarova, M. (2014). Large copy number variations in combination with point mutations in the TYMP and SCO2 genes found in two patients with mitochondrial disorders. Eur J Hum Genet *22*, 431-434.

71. Magner, M., Vesela, K., Honzik, T., Jesina, P., Vobruba, V., Petrak, B., Zeman, K., Klement, P. (2010). Mitochondriální encefalomyopatie na podkladě deficitu proteinu Sco2 s obrazem SMA-like neurogenní svalové atrofie – kazuistiky. Cesk Slov Neurol N *73*, 73-75.

72. Dvorakova, V., Kolarova, H., Magner, M., Tesarova, M., Hansikova, H., Zeman, J., Honzik, T. (2016). The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers. Mol Genet Metab *118*, 288-295.

73. Tesarova, M., Hansikova, H., Kytnarova, J., Houstkova, H., Bohm, M., Cerna, L., Zeman, J., Houstek, J. (2004). Clinical Heterogeneity, Tissue Distribution, and Inter-generational Segregation of mtDNA Mutation A3243G. Toxicol Mech Methods *14*, 79-84.

74. Kaplanova, V., Zeman, J., Hansikova, H., Cerna, L., Houst'kova, H., Misovicova, N., Houstek, J. (2004). Segregation pattern and biochemical effect of the G3460A mtDNA mutation in 27 members of LHON family. J Neurol Sci *223*, 149-155.

75. Liskova, P., Tesarova, M., Dudakova, L., Svecova, S., Kolarova, H., Honzik, T., Se-to, S., Votruba, M. (2016). OPA1 analysis in an international series of probands with bilateral optic atrophy. Acta Ophthalmol *95*, 363-369

76. Ješina, P., Vinsova, K., Brantova, O., Tesarova, M., Hajkova, Z., Hansikova, H., Wenchich, L., Honzik, T., Magner, M., Zamecnik, J., et al. (2010). Myoklonická epilepsie a hluchota u sourozenců s mutací 7512T>C v genu pro mitochondriální tRNASer(UCN) – kazuistiky. Cesk Slov Neurol N *73*, 68-72.

77. Honzik, T., Tesarova, M., Hansikova, H., Krijt, J., Benes, P., Zamecnik, J., Wen-chich, L., Zeman, J. (2006). [Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyo-pathy (MNGIE)]. Cas lek cesk *145*, 665-670.

78. Mazurova, S., Magner, M., Kucerova-Vidrova, V., Vondrackova, A., Stranecky, V., Pristoupilova, A., Zamecnik, J., Hansikova, H., Zeman, J., Tesarova, M., et al. (2017). Thymidine kinase 2 and alanyl-tRNA synthetase 2 deficiencies cause lethal mitochondrial cardiomyopathy: case reports and review of the literature. Cardiol Young *27*, 936-944.

79. Kanaumi, T., Hirose, S., Goto, Y., Naitou, E., Mitsudome, A. (2006). An infant with a mitochondrial A3243G mutation demonstrating the MELAS phenotype. Pediatr Neurol *34*, 235-238.

80. Wortmann, S.B., Rodenburg, R.J., Backx, A.P., Schmitt, E., Smeitink, J.A., Morava, E. (2007). Early cardiac involvement in children carrying the A3243G mtDNA mutation. Acta Paediatr *96*, 450-451.

81. Vanniarajan, A., Nayak, D., Reddy, A.G., Singh, L., Thangaraj, K. (2006). Clinical and genetic uniqueness in an individual with MELAS. Am J Med Genet Neuropsychatr Genet *141b*, 440-444.

82. Chinnery, P.F., Howell, N., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M. (1997). Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and cli-nical phenotypes. Brain *120 (Pt 10)*, 1713-1721.

83. Masri, A., Al-Ammouri, I. (2016). Clinical presentation, etiology, and outcome of stroke in children: A hospital-based study. Brain Dev *38*, 204-208.

84. Mancuso, M., Orsucci, D., Angelini, C., Bertini, E., Carelli, V., Comi, G.P., Donati, A., Minetti, C., Moggio, M., Mongini, T., et al. (2014). The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? J Neurol *261*, 504-510.

85. Nesbitt, V., Pitceathly, R.D., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., Sweeney, M.G., Mudanohwo, E.E., Rahman, S., Hanna, M.G., McFarland, R. (2013). The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation--implications for diagnosis and management. J Neurol Neurosurg Psychiatry *84*, 936-938.

86. Knox, D.L., Chen, M.F., Guilarte, T.R., Dang, C.V., Burnette, J. (1982). Nutritional amblyopia. Folic acid, vitamin B-12, and other vitamins. Retina *2*, 288-293.

87. Golnik, K.C., Schaible, E.R. (1994). Folate-responsive optic neuropathy. J Neuroophthalmol *14*, 163-169.

88. Sadun, A.A., Wang, M.Y. (2008). Ethambutol optic neuropathy: how we can prevent 100,000 new cases of blindness each year. J Neuroophthalmol *28*, 265-268.

89. Talbert Estlin, K.A., Sadun, A.A. (2010). Risk factors for ethambutol optic toxicity. Int Ophthalmol *30*, 63-72.

90. Li, J., Tripathi, R.C., Tripathi, B.J. (2008). Drug-induced ocular disorders. Drug saf *31*, 127-141.

91. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Burke, A., Sellar, P.W., Clarke, M.P., Gnanaraj, L. (2010). The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. Ophthalmology *117*, 1538-1546.

92. Gronlund, M.A., Honarvar, A.K., Andersson, S., Moslemi, A.R., Oldfors, A., Holme, E., Tulinius, M., Darin, N. (2010). Ophthalmological findings in children and young adults with genetically verified mitochondrial disease. Br J Ophthalmol *94*, 121-127.
93. Hirano, M., Pavlakis, S.G. (1994). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes (MELAS): current concepts. J Child Neurol *9*, 4-13.
94. Blakely, E.L., de Silva, R., King, A., Schwarzer, V., Harrower, T., Dawidek, G., Turnbull, D.M., Taylor, R.W. (2005). LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial MTND1 gene mutation. Eur J Hum Genet *13*, 623-627.
95. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Chinnery, P.F. (2011). Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. Prog Retin Eye Res *30*, 81-114.
96. Chang, C.R., Blackstone, C. (2010). Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. Ann N Y Acad Sci *1201*, 34-39.
97. Cho, D.H., Nakamura, T., Lipton, S.A. (2010). Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. Cell Mol Life Sci, 3435-3447.
98. Zuchner, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Claeys, K.G., Guergueltcheva, V., Cherninkova, S., Hamilton, S.R., Van Stavern, G., Krajewski, K.M., Stajich, J., et al. (2006). Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. Ann Neurol *59*, 276-281.
99. Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., et al. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. Nat Genet *36*, 449-451.
100. Sadun, A.A., La Morgia, C., Carelli, V. (2013). Mitochondrial optic neuropathies: our travels from bench to bedside and back again. Clin Exp Ophthalmol *41*, 702-712.
101. Carelli, V., Ross-Cisneros, F.N., Sadun, A.A. (2004). Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. Prog Retin Eye Res *23*, 53-89.
102. Bristow, E.A., Griffiths, P.G., Andrews, R.M., Johnson, M.A., Turnbull, D.M. (2002). The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. Arch Ophthalmol *120*, 791-796.
103. Howell, N. (1998). Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve. Vision Res *38*, 1495-1504.

104. Sadun, A.A., Win, P.H., Ross-Cisneros, F.N., Walker, S.O., Carelli, V. (2000). Leber's hereditary optic neuropathy differentially affects smaller axons in the optic nerve. Trans Am Ophthal Soc *98*, 223-232.

105. The optic nerve. Ento Key (2016). URL: https://entokey.com/the-optic-nerve/. Volume 2017. Last acces 18th December 2017.

106. Gonzalez-Halphen, D., Ghelli, A., Iommarini, L., Carelli, V., Esposti, M.D. (2011). Mitochondrial complex I and cell death: a semi-automatic shotgun model. Cell Death Dis *2*, e222.

107. Zickermann, V., Drose, S., Tocilescu, M.A., Zwicker, K., Kerscher, S., Brandt, U. (2008). Challenges in elucidating structure and mechanism of proton pumping NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). J Bioener Biomembr *40*, 475-483.

108. Fraser, J.A., Biousse, V., Newman, N.J. (2010). The neuro-ophthalmology of mitochondrial disease. Surv Ophthalmol *55*, 299-334.

109. Lenaz, G. (2012). Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? Adv Exp Med Biol *942*, 93-136.

110. Kirkman, M.A., Yu-Wai-Man, P., Korsten, A., Leonhardt, M., Dimitriadis, K., De Coo, I.F., Klopstock, T., Chinnery, P.F. (2009). Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. Brain *132*, 2317-2326.

111. Giordano, C., Montopoli, M., Perli, E., Orlandi, M., Fantin, M., Ross-Cisneros, F.N., Caparrotta, L., Martinuzzi, A., Ragazzi, E., Ghelli, A., et al. (2011). Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain *134*, 220-234.

112. Kolářová, H., Honzik, T., Ďuďáková, L., Kousal, B., Kulhánek, J., Diblík, P., Tesařová, M., Havránková, P., Forgáč, M., Zeman, J., et al. (2017). Leberova hereditární neuropatie optiku. Cesk Neurol Neurochir *113*, 534-544.

113. Yu-Wai-Man, P. Turnbull, D.M., Chinnery, P.F. (2002). Leber hereditary optic neuropathy. J Med Genet *39*, 162-169.

114. Nikoskelainen, E.K., Huoponen, K., Juvonen, V., Lamminen, T., Nummelin, K., Savontaus, M.L. (1996). Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. Ophthalmology *103*, 504-514.

115. Riordan-Eva, P., Sanders, M.D., Govan, G.G., Sweeney, M.G., Da Costa, J., Har-ding, A.E. (1995). The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defi-ned by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. Brain *118 (Pt 2)*, 319-337.

116. Riordan-Eva, P., Harding, A.E. (1995). Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. J Med Genet *32*, 81-87.
117. Nakamura, M., Yamamoto, M. (2000). Variable pattern of visual recovery of Leber's hereditary optic neuropathy. Br J Ophthalmol *84*, 534-535.
118. Smith, J.L., Hoyt, W.F., Susac, J.O. (1973). Ocular fundus in acute Leber optic neuropathy. Arch Ophthalmol *90*, 349-354.
119. Nikoskelainen, E., Sogg, R.L., Rosenthal, A.R., Friberg, T.R., Dorfman, L.J. (1977). The early phase in Leber hereditary optic atrophy. Arch Ophthalmol *95*, 969-978.
120. Chalmers, R.M., Schapira, A.H. (1999). Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. Biochim Biophys Acta *1410*, 147-158.
121. de Carlo, T.E., Romano, A., Waheed, N.K., Duker, J.S. (2015). A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). Int J Retina Vitreous *1*, 5.
122. Spaide, R.F., Fujimoto, J.G., Waheed, N.K. (2015). Image artifacts in optical coherence tomography angiography. Retina *35*, 2163-2180.
123. Savini, G., Barboni, P., Valentino, M.L., Montagna, P., Cortelli, P., De Negri, A.M., Sadun, F., Bianchi, S., Longanesi, L., Zanini, M., et al. (2005). Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy mutations. Ophthalmology *112*, 127-131.
124. Sacai, P.Y., Salomao, S.R., Carelli, V., Pereira, J.M., Belfort, R., Jr., Sadun, A.A., Berezovsky, A. (2010). Visual evoked potentials findings in non-affected subjects from a large Brazilian pedigree of 11778 Leber's hereditary optic neuropathy. Doc Ophthalmol *121*, 147-154.
125. Mashima, Y., Kigasawa, K., Hasegawa, H., Tani, M., Oguchi, Y. (1996). High incidence of pre-excitation syndrome in Japanese families with Leber's hereditary optic neuropathy. Clin Genet *50*, 535-537.
126. Nikoskelainen, E.K., Marttila, R.J., Huoponen, K., Juvonen, V., Lamminen, T., Sonninen, P., Savontaus, M.L. (1995). Leber's "plus": neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry *59*, 160-164.
127. La Morgia, C., Achilli, A., Iommarini, L., Barboni, P., Pala, M., Olivieri, A., Zanna, C., Vidoni, S., Tonon, C., Lodi, R., et al. (2008). Rare mtDNA variants in Leber hereditary optic neuropathy families with recurrence of myoclonus. Neurology *70*, 762-770.

128. Newman, N.J. (1993). Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. Arch Neurol *50*, 540-548.
129. Wallace, D.C. (1970). A new manifestation of Leber's disease and a new explanation for the agency responsible for its unusual pattern of inheritance. Brain *93*, 121-132.
130. Gropman, A., Chen, T.J., Perng, C.L., Krasnewich, D., Chernoff, E., Tifft, C., Wong, L.J. (2004). Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. Am J Med Genet A *124a*, 377-382.
131. De Vries, D.D., Went, L.N., Bruyn, G.W., Scholte, H.R., Hofstra, R.M., Bolhuis, P.A., van Oost, B.A. (1996). Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. Am J Hum Genet *58*, 703-711.
132. Howell, N., Kubacka, I., Xu, M., McCullough, D.A. (1991). Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial ND1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. Am J Hum Genet *48*, 935-942.
133. Meire, F.M., Van Coster, R., Cochaux, P., Obermaier-Kusser, B., Candaele, C., Martin, J.J. (1995). Neurological disorders in members of families with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) caused by different mitochondrial mutations. Ophthalmic Genet *16*, 119-126.
134. Larsson, N.G., Andersen, O., Holme, E., Oldfors, A., Wahlstrom, J. (1991). Leber's hereditary optic neuropathy and complex I deficiency in muscle. Ann Neurol *30*, 701-708.
135. Kolarova, H., Liskova, P., Tesarova, M., Vidrova, V.K., Forgac, M., Zamecnik, J., Hansikova, H., Honzik, T. (2016). Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5. Ophthalmic Genet *37(4)*: 419-423.
136. Patsi, J., Maliniemi, P., Pakanen, S., Hinttala, R., Uusimaa, J., Majamaa, K., Nystrom, T., Kervinen, M., Hassinen, I.E. (2012). LHON/MELAS overlap mutation in ND1 subunit of mitochondrial complex I affects ubiquinone binding as revealed by modeling in Escherichia coli NDH-1. Biochim Biophys Acta *1817*, 312-318.
137. Martikainen, M.H., Ng, Y.S., Gorman, G.S., Alston, C.L., Blakely, E.L., Schaefer, A.M., Chinnery, P.F., Burn, D.J., Taylor, R.W., McFarland, R., et al. (2016). Cli-nical, Genetic, and Radiological Features of Extrapyramidal Movement Disorders in Mitochondrial Disease. JAMA Neurol *73*, 668-674.
138. Finsterer, J., Zarrouk-Mahjoub, S. (2017). Epilepsia partialis continua in MELAS/Leigh overlap syndrome. Brain Dev *39*, 365.

139. Guerriero, S., Vetrugno, M., Ciraci, L., Artuso, L., Dell'aglio, R., Petruzzella, V. (2011). Bilateral progressive visual loss in an epileptic, mentally retarded boy. Middle East Afr J Ophthalmol *18*, 67-70.

140. Lyle, W. ed. (1990). Genetic risks (Waterloo, Ontario: University of Waterloo Press).

141. Kjer, B., Eiberg, H., Kjer, P., Rosenberg, T. (1996). Dominant optic atrophy mapped to chromosome 3q region. II. Clinical and epidemiological aspects. Acta Ophthalmol Scand *74*, 3-7.

142. Lenaers, G., Hamel, C., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., Milea, D. (2012). Dominant optic atrophy. Orphanet J Rare D *7*, 46.

143. Delettre, C., Lenaers, G., Pelloquin, L., Belenguer, P., Hamel, C.P. (2002). OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. Mol Genet Metab *75*, 97-107.

144. Assink, J.J., Tijmes, N.T., ten Brink, J.B., Oostra, R.J., Riemslag, F.C., de Jong, P.T., Bergen, A.A. (1997). A gene for X-linked optic atrophy is closely linked to the Xp11.4-Xp11.2 region of the X chromosome. Am J Hum Genet *61*, 934-939.

145. Reynier, P., Amati-Bonneau, P., Verny, C., Olichon, A., Simard, G., Guichet, A., Bonnemains, C., Malecaze, F., Malinge, M.C., Pelletier, J.B., et al. (2004). OPA3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. J Med Genet *41*, e110.

146. Kerrison, J.B., Arnould, V.J., Ferraz Sallum, J.M., Vagefi, M.R., Barmada, M.M., Li, Y., Zhu, D., Maumenee, I.H. (1999). Genetic heterogeneity of dominant optic atrophy, Kjer type: Identification of a second locus on chromosome 18q12.2-12.3. Arch Ophthalmol *117*, 805-810.

147. Gerber, S., Charif, M., Chevrollier, A., Chaumette, T., Angebault, C., Kane, M.S., Paris, A., Alban, J., Quiles, M., Delettre, C., et al. (2017). Mutations in DNM1L, as in OPA1, result indominant optic atrophy despite opposite effectson mitochondrial fusion and fission. Brain *140*, 2586-2596.

148. Barbet, F., Gerber, S., Hakiki, S., Perrault, I., Hanein, S., Ducroq, D., Tanguy, G., Dufier, J.L., Munnich, A., Rozet, J.M., et al. (2003). A first locus for isolated autosomal recessive optic atrophy (ROA1) maps to chromosome 8q. Eur J Hum Genet *11*, 966-971.

149. Hanein, S., Perrault, I., Roche, O., Gerber, S., Khadom, N., Rio, M. (2009). TMEM126A, encoding a mitochondrial protein, is mutated in autosomal-recessive nonsyndromic optic atrophy. Am J Hum Genet *84*.

150. Carelli, V., Schimpf, S., Fuhrmann, N., Valentino, M.L., Zanna, C., Iommarini, L. (2011). A clinically complex form of dominant optic atrophy (OPA8) maps on chromosome 16. Hum Mol Genet *20*.

151. Metodiev, M.D., Gerber, S., Hubert, L., Delahodde, A., Chretien, D., Gerard, X., Amati-Bonneau, P., Giacomotto, M.C., Boddaert, N., Kaminska, A., et al. (2014). Mutations in the tricarboxylic acid cycle enzyme, aconitase 2, cause either isolated or syndromic optic neuropathy with encephalopathy and cerebellar atrophy. J Med Genet *51*, 834-838.

152. Angebault, C., Guichet, P.O., Talmat-Amar, Y., Charif, M., Gerber, S., Fares-Taie, L., Gueguen, N., Halloy, F., Moore, D., Amati-Bonneau, P., et al. (2015). Recessive Mutations in RTN4IP1 Cause Isolated and Syndromic Optic Neuropathies. Am J Hum Genet *97*, 754-760.

153. Hartmann, B., Wai, T., Hu, H., MacVicar, T., Musante, L., Fischer-Zirnsak, B., Stenzel, W., Graf, R., van den Heuvel, L., Ropers, H.H., et al. (2016). Homozygous YME1L1 mutation causes mitochondriopathy with optic atrophy and mitochondrial network fragmentation. eLife *5*.

154. Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L. (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. Hum Genet *109*.

155. Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. J Biol Chem *278*, 7743-7746.

156. Olichon, A., Landes, T., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L.J., Mils, V., Guichet, A., Delettre, C., Hamel, C., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., et al. (2007). Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. J Cell Physiol *211*, 423-430.

157. Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. Embo J *25*, 2966-2977.

158. Duvezin-Caubet, S., Koppen, M., Wagener, J., Zick, M., Israel, L., Bernacchia, A., Jagasia, R., Rugarli, E.I., Imhof, A., Neupert, W., et al. (2007). OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. Mol Biol Cell *18*, 3582-3590.

159. Ferre, M., Bonneau, D., Milea, D., Chevrollier, A., Verny, C., Dollfus, H. (2009). Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. Hum Mutat *30*.

160. Puomila, A., Huoponen, K., Mantyjarvi, M., Hamalainen, P., Paananen, R., Sankila, E.M., Savontaus, M.L., Somer, M., Nikoskelainen, E. (2005). Dominant optic atrophy: correlation between clinical and molecular genetic studies. Acta Ophthalmol Scand *83*, 337-346.

161. Votruba, M., Moore, A.T., Bhattacharya, S.S. (1998). Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. J Med Genet *35*, 793-800.

162. Schimpf, S., Fuhrmann, N., Schaich, S., Wissinger, B. (2008). Comprehensive cDNA study and quantitative transcript analysis of mutant OPA1 transcripts containing premature termination codons. Hum Mutat *29*, 106-112.

163. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Gorman, G.S., Lourenco, C.M., Wright, A.F., Auer-Grumbach, M., Toscano, A., Musumeci, O., Valentino, M.L., Caporali, L., et al. (2010). Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. Brain *133*, 771-786.

164. Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., Hamel, C.P. (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. Hum Genet *109*, 584-591.

165. Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet *26*, 207-210.

166. Amati-Bonneau, P., Valentino, M.L., Reynier, P., Gallardo, M.E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J.G., Carroccia, R., et al. (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. Brain *131*, 338-351.

167. Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., et al. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat Genet *26*, 211-215.

168. Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., et al. (2008). Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. Brain *131*, 329-337.

169. Agier, V., Oliviero, P., Laine, J., L'Hermitte-Stead, C., Girard, S., Fillaut, S., Jardel, C., Bouillaud, F., Bulteau, A.L., Lombes, A. (2012). Defective mitochondrial fusion, altered respiratory function, and distorted cristae structure in skin fibroblasts with heterozygous OPA1 mutations. Biochim Biophys Acta *1822*, 1570-1580.

170. Cohn, A.C., Toomes, C., Potter, C., Towns, K.V., Hewitt, A.W., Inglehearn, C.F., Craig, J.E., Mackey, D.A. (2007). Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations. Am J Ophthalmol *143*, 656-662.

171. Rocca, M.A., Bianchi-Marzoli, S., Messina, R., Cascavilla, M.L., Zeviani, M., Lamperti, C., Milesi, J., Carta, A., Cammarata, G., Leocani, L., et al. (2015). Distributed abnormalities of brain white matter architecture in patients with dominant optic atrophy and OPA1 mutations. J Neurol *262*, 1216-1227.

172. Barboni, P., Savini, G., Parisi, V., Carbonelli, M., La Morgia, C., Maresca, A., Sa-dun, F., De Negri, A.M., Carta, A., Sadun, A.A., et al. (2011). Retinal nerve fiber layer thickness in dominant optic atrophy measurements by optical coherence tomo-graphy and correlation with age. Ophthalmology *118*, 2076-2080.

173. La Morgia, C., Carbonelli, M., Barboni, P., Sadun, A.A., Carelli, V. (2014). Medical management of hereditary optic neuropathies. Frontiers in neurology *5*, 141.

174. Lopez Sanchez, M.I., Crowston, J.G., Mackey, D.A., Trounce, I.A. (2016). Emerging Mitochondrial Therapeutic Targets in Optic Neuropathies. Pharmacol Ther *165*, 132-152.

175. Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., et al. (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. Brain *131*, 352-367.

176. Gueven, N., Woolley, K., Smith, J. (2015). Border between natural product and drug: comparison of the related benzoquinones idebenone and coenzyme Q10. Redox Biol *4*, 289-295.

177. Klopstock, T., Yu-Wai-Man, P., Dimitriadis, K., Rouleau, J., Heck, S., Bailie, M., Atawan, A., Chattopadhyay, S., Schubert, M., Garip, A., et al. (2011). A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain *134*, 2677-2686.

178. Barboni, P., Valentino, M.L., La Morgia, C., Carbonelli, M., Savini, G., De Negri, A., Simonelli, F., Sadun, F., Caporali, L., Maresca, A., et al. (2013). Idebenone treat-ment in patients with OPA1-mutant dominant optic atrophy. Brain *136*, e231.

179. Shrader, W.D., Amagata, A., Barnes, A., Enns, G.M., Hinman, A., Jankowski, O., Kheifets, V., Komatsuzaki, R., Lee, E., Mollard, P., et al. (2011). alpha-Tocotrienol quinone modulates oxidative stress response and the biochemistry of aging. Bioorg Med Chem Lett *21*, 3693-3698.

180. Sadun, A.A., Chicani, C.F., Ross-Cisneros, F.N., Barboni, P., Thoolen, M., Shrader, W.D., Kubis, K., Carelli, V., Miller, G. (2012). Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. Arch Neurol *69*, 331-338.

181. Wan, X., Pei, H., Zhao, M.J., Yang, S., Hu, W.K., He, H., Ma, S.Q., Zhang, G., Dong, X.Y., Chen, C., et al. (2016). Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Sci Rep *6*, 21587.

182. Pejznochova, M., Tesarova, M., Hansikova, H., Magner, M., Honzik, T., Vinsova, K., Hajkova, Z., Havlickova, V., Zeman, J. (2010). Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development. Mitochondrion *10*, 321-329.

183. Spacilova, J., Hulkova, M., Hrustincova, A., Capek, V., Tesarova, M., Hansikova, H., Zeman, J. (2016). Analysis of expression profiles of genes involved in F(o)F(1)-ATP synthase biogenesis during perinatal development in rat liver and skeletal muscle. Physiol Res *65*, 597-608.

184. Cizkova, A., Stranecky, V., Mayr, J.A., Tesarova, M., Havlickova, V., Paul, J., Ivanek, R., Kuss, A.W., Hansikova, H., Kaplanova, V., et al. (2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. Nat Genet *40*, 1288-1290.

185. Park, E.J., Grabinska, K.A., Guan, Z., Stranecky, V., Hartmannova, H., Hodanova, K., Baresova, V., Sovova, J., Jozsef, L., Ondruskova, N., et al. (2014). Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation. Cell metab *20*, 448-457.

186. Schueler, M., Braun, D.A., Chandrasekar, G., Gee, H.Y., Klasson, T.D., Halbritter, J., Bieder, A., Porath, J.D., Airik, R., Zhou, W., et al. (2015). DCDC2 mutations cause a renal-hepatic ciliopathy by disrupting Wnt signaling. Am J Hum Genet *96*, 81-92.

187. Kevelam, S.H., Bierau, J., Salvarinova, R., Agrawal, S., Honzik, T., Visser, D., Weiss, M.M., Salomons, G.S., Abbink, T.E., Waisfisz, Q., et al. (2015). Recessive ITPA mutations cause an early infantile encephalopathy. Ann Neurol *78*, 649-658.

188. Bonavaud, S., Agbulut, O., Nizard, R., D'Honneur, G., Mouly, V., Butler-Browne, G. (2001). A discrepancy resolved: human satellite cells are not preprogrammed to fast and slow lineages. Neuromuscul Disord *11*, 747-752.

189. Romansky, S.G., Landing, B.H., Van deVelde, S. (1982). Patterns of alkaline phosphatase activity in muscle biopsies of children and correlation with immuno-fluorescence. Lab Invest *46*.

190. Johnson, M.A., Sideri, G., Weightman, D., Appleton, D. (1973). A comparison of fibre size, fibre type constitution and spatial fibre type distribution in normal human muscle and in muscle from cases of spinal muscular atrophy and from other neuro-muscular disorders. J Neurol Sci *20*, 345-361.

191. Emery, J.L. (1963). FUNCTIONAL ASYMMETRY OF THE LIVER. Ann N Y Acad Sci *111*, 37-44.

192. Rickwood, D., Wilson, M.T., Darley-Usmar, V.M. (1987). Isolation and characteristics of intact mitochondria. (Oxford, UK: IRL Press).

193. Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gérard, B., Rotig, A., Saudubray, J.M., and Munnoch, A. (1994). Biochemical and molecular investigations in the respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta *228*, 35-51.

194. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem *193*, 265-275.

195. Pejznochova, M., Tesarova, M., Honzik, T., Hansikova, H., Magner, M., Zeman, J. (2008). The developmental changes in mitochondrial DNA content per cell in human cord blood leukocytes during gestation. Physiol Res *57*, 947-955.

196. Ehling, R., Noskova, L., Stranecky, V., Hartmannova, H., Pristoupilova, A., Hodanova, K., Benke, T., Kovacs, G.G., Strobel, T., Niedermuller, U., et al. (2013). Cerebellar dysfunction in a family harboring the PSEN1 mutation co-segregating with a cathepsin D variant p.A58V. J Neurol Sci *326*, 75-82.

197. Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Beroud, G., Claustres, M., Beroud, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acids Res *37*, e67.

198. Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D., Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in Genie. J Comput Biol *4*, 311-323.

199. Yeo, G., Burge, C.B. (2004). Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. J Comput Biol *11*, 377-394.

200. Brunak, S., Engelbrecht, J., Knudsen, S. (1991). Prediction of human mRNA donor acceptor sites from the DNA sequence. J Mol Biol *220*, 49-65.

201. Hamilton, P.W., Allen, D.C. (1995). Morphometry in histopathology. J Pathol *175*, 369-379.

202. Sheehan, D.C., Hrapchak, B.B. (1987). Theory and practice of histotechnology., 2nd Edition, (Columbus, Ohio, Detroit, Mich: Battelle Press).

203. Chung, H.K., Han, Y.K., Oh, S., Kim, S.H. (2016). Comparison of Optical Cohe-rence Tomography Measurement Reproducibility between Children and Adults. PLoS One *11*, e0147448.

204. Shoji, T., Sakurai, Y., Chihara, E., Nishikawa, S., Omae, K. (2009). Reference intervals and discrimination values of the Lanthony desaturated D-15 panel test in young to middle-aged Japanese army officials: the Okubo Color Study Report 1. Eye (Lond) *23*, 1329-1335.

205. Leat, S.J., Legge, G.E., Bullimore, M.A. (1999). What is low vision? A re-evaluation of definitions. Optom Vis Sci *76*, 198-211.

206. Ondruskova, N., Honzik, T., Kytnarova, J., Matoulek, M., Zeman, J., Hansikova, H. (2015). Isoelectric Focusing of Serum Apolipoprotein C-III as a Sensitive Screening Method for the Detection of O-glycosylation Disturbances. Prague Med Rep *116*, 73-86.

207. Wopereis, S., Morava, E., Grunewald, S., Adamowicz, M., Huijben, K.M., Lefeber, D.J., Wevers, R.A. (2005). Patients with unsolved congenital disorders of glycosylation type II can be subdivided in six distinct biochemical groups. Glycobiology *15*, 1312-1319.

208. Wada, Y., Kadoya, M., Okamoto, N. (2012). Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. Glycobiology *22*, 1140-1144.

209. Klinge, C.M. (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. J Cell Biochem *105*, 1342-1351.

210. Brown, M. (2008). Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. Adv Physiol Educ *32*, 120-126.

211. Huang, W.C., Ferris, E., Cheng, T., Horndli, C.S., Gleason, K., Tamminga, C., Wagner, J.D., Boucher, K.M., Christian, J.L., Gregg, C. (2017). Diverse Non-genetic,

Allele-Specific Expression Effects Shape Genetic Architecture at the Cellular Level in the Mammalian Brain. Neuron *93*, 1094-1109.e1097.

212. Kolarova, H., Tesarova, M., Liskova, P., Kousal, B., Forgac, M., Havrankova, P., Zeman, J., Honzik, T. (2017). Extraocular symptoms may be the only presentation in LHON patients with m.11778G>A. In Euromit 2017, M.P.i.f.b.o.a. CECAD, University of Cologne, ed. (Cologne: University of Cologne), p. C38.
213. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Howell, N., Turnbull, D.M., Chinnery, P.F. (2016). The Epidemiology of Leber Hereditary Optic Neuropathy in the North East of Engl. Am J Hum Genet *98*, 1271.
214. De Rojas, J.O., Rasool, N., Chen, R.W., Horowitz, J., Odel, J.G. (2016). Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. Neurology *87*, 2065-2066.
215. Gaier, E.D., Gittinger, J.W., Cestari, D.M., Miller, J.B. (2016). Peripapillary Capillary Dilation in Leber Hereditary Optic Neuropathy Revealed by Optical Coherence Tomographic Angiography. JAMA Ophthalmol *134*, 1332-1334.
216. Jacobson, D.M., Stone, E.M., Miller, N.R., Pollock, S.C., Fletcher, W.A., McNussen, P.J., Martin, T.J. (1998). Relative afferent pupillary defects in patients with Leber hereditary optic neuropathy and unilateral visual loss. Am J Ophthalmol *126*, 291-295.
217. Dandekar, S.S., Graham, E.M., Plant, G.T. (2002). Ladies with Leber's hereditary optic neuropathy: an atypical disease. Eur J Ophthalmol *12*, 537-541.
218. Nagai, A., Nakamura, M., Kusuhara, S., Kanamori, A., Negi, A. (2005). Unilateral manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy after blunt ocular trauma. Jpn J Ophthalmol *49*, 65-67.
219. Sugisaka, E., Ohde, H., Shinoda, K., Mashima, Y. (2007). Woman with atypical unilateral Leber's hereditary optic neuropathy with visual improvement. Clin Exp Ophthalmol *35*, 868-870.
220. Kaufmann, P., Engelstad, K., Wei, Y., Kulikova, R., Oskoui, M., Sproule, D.M., Battista, V., Koenigsberger, D.Y., Pascual, J.M., Shanske, S., et al. (2011). Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype. Neurology *77*, 1965-1971.
221. Zhao, D., Hong, D., Zhang, W., Yao, S., Qi, X., Lv, H., Zheng, R., Feng, L., Huang, Y., Yuan, Y., et al. (2011). Mutations in mitochondrially encoded complex I enzyme as the second common cause in a cohort of Chinese patients with mitochondrial myo-

pathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. J Hum Genet *56*, 759-764.

222. Hofman, P., Hoyng, P., vanderWerf, F., Vrensen, G.F., Schlingemann, R.O. (2001). Lack of blood-brain barrier properties in microvessels of the prelaminar optic nerve head. Invest Ophthalmol Vis Sci *42*, 895-901.

223. Pesch, U.E., Leo-Kottler, B., Mayer, S., Jurklies, B., Kellner, U., Apfelstedt-Sylla, E. (2001). OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. Hum Mol Genet *10*.

224. Schimpf, S., Schaich, S., Wissinger, B. (2006). Activation of cryptic splice sites is a frequent splicing defect mechanism caused by mutations in exon and intron se-quences of the OPA1 gene. Hum Genet *118*.

225. Baris, O., Delettre, C., Amati-Bonneau, P., Surget, M.O., Charlin, J.F., Catier, A. (2003). Fourteen novel OPA1 mutations in autosomal dominant optic atrophy including two de novo mutations in sporadic optic atrophy. Hum Mutat *21*.

7 SUPPLEMENTS

Supplement 1]

Magner, M., ***Kolarova, H.****, Honzik, T., Svandova, I., Zeman, J.*

Clinical manifestation of mitochondrial diseases.

Dev Period Med 2015 19(4), 441-449.

© IMiD, Wydawnictwo Aluna

Martin Magner[1], Hana Kolářová[1], Tomáš Honzík[1], Ivana Švandová[2], Jiří Zeman[1]

CLINICAL MANIFESTATION OF MITOCHONDRIAL DISEASES*

MANIFESTACJA KLINICZNA CHORÓB MITOCHONDRIALNYCH

[1]Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague
[2]Department of Physiology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Abstract

Mitochondrial disorders (MD) represent a clinically, biochemically and genetically heterogeneous group of diseases associated with dysfunction of the oxidative phosphorylation system and pyruvate dehydrogenase complex. Our aim was to illustrate the most common clinical presentation of MD on the example of selected diseases and syndromes. The minimal prevalence of MD is estimated as 1 to 5,000. MD may manifest at any age since birth until late-adulthood with acute manifestation or as a chronic progressive disease. Virtually any organ may be impaired, but the organs with the highest energetic demands are most frequently involved, including brain, muscle, heart and liver. Some MD may manifest as a characteristic cluster of clinical features (e.g. MELAS syndrome, Kearns-Sayre syndrome). Diagnostics includes detailed history, the comprehensive clinical examination, results of specialized examinations (especially cardiology, visual fundus examination, brain imaging, EMG), laboratory testing of body fluids (lactate, aminoacids, organic acids), and analysis of bioptic samples of muscle, skin, and liver, eventually. Normal lactate level in blood does not exclude the possibility of MD. Although the aimed molecular genetic analyses may be indicated in some of mitochondrial diseases, the methods of next generation sequencing come into focus. Examples of treatment are arginine supplementation in MELAS syndrome, ketogenic diet in pyruvate oxidation disorders or quinone analogs in patients with LHON. Conclusion: The clinical suspicion of a mitochondrial disorder is often delayed, or the disease remains undiagnosed. The correct diagnosis and adequate treatment can improve prognosis of the patient. Access to genetic counseling is also of great importance.

Key words: mitochondrial disorders, clinical manifestation

DEV PERIOD MED. 2015;XIX,4:441-449

1. INTRODUCTION

Mitochondria are double-membrane embedded semiautonomous organelles of eucaryotic cells which constitute highly dynamic and plastic networks of a great ability to change their shape, fuse with one another and then separate again [1]. According to endosymbiotic theory, the origin of mitochondria lies in the engulfment of aerobic bacterial cell by primitive eucaryotic cell, approx. 2,300 million years ago. This hypothesis would explain the presence of mitochondrial DNA (mtDNA) and proteosynthetic apparatus [2]. Main task of mitochondria is to oxidize substrates to produce energy and to sustain amphibolic pathways, such as the tricarboxylic acid cycle essential for survival. The system of oxidative phosphorylation (OXPHOS) serves as a major energy-supplying process, which utilises redox equivalents (NADH and $FADH_2$) raised by substrates oxidation to ATP.

Mitochondrial disorders represent a clinically, biochemically and genetically heterogeneous group of diseases associated with dysfunction of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) and pyruvate

*Supported by RVO-VFN 64165/2012, IGA NT 14156/3 and GA UK 38515/2015.

dehydrogenase complex. Elliot and colleagues [3] showed that the prevalence of pathogenic mtDNA mutations is at least 1 to 200. However, the most of the carriers of pathogenic mutations in mtDNA are asymptomatic. Thus, the prevalence of mitochondrial disorders including both mtDNA and nuclear DNA (nDNA) disorders is estimated as 1 to 5,000 [4].

The clinical manifestation of mitochondrial diseases is very heterogenous. The presentation usually depends on generalised or tissue-specific decrease in ATP production. Some mitochondrial disorders affect a single organ (e.g. the eye in Leber hereditary optic neuropathy), but many involve multiple organ systems. Virtually any organ may be impaired, but the organs with the highest energetic demands are most frequently involved, including brain, muscle, heart and liver (tab. I). Mitochondrial diseases may manifest at any age since birth until late-adulthood with acute manifestation or as a chronic progressive disease [5].

The clinical presentation and course of patients with mitochondrial syndromes are extremely diverse, even among patients or relatives with identical enzymatic or genetic defects. The range of symptoms of mitochondrial disorders is broad and includes almost all CNS functions, vision and hearing, heart and skeletal muscle, gastrointestinal tract, kidneys, endocrine glands and haematological changes. Many mitochondrial disorders may manifest as a characteristic cluster of clinical features [6]. These include e.g. Kearns-Sayre syndrome (KSS), chronic progressive external ophtalmoplegia (CPEO), mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS), myoclonic epilepsy with ragged-red fibres (MERRF), and neurogenic weakness with ataxia and retinitis pigmentosa (NARP). However, there is often considerable clinical variability and many affected individuals do not fit into one particular category. Mutations in *POLG1* gene, which have emerged as a major cause of mitochondrial disease, illustrate this well. They have been associated with severe multi-system disease, including Parkinson's syndrome (tremor, hypokinesia, rigidity), autosomal dominant or recessive CPEO, a MERRF-like phenotype, Alpers-Huttenlocher syndrome, ataxia, or premature menopause [7].

Table I. Frequency of the most common symptoms in children with isolated or combined cytochrome *c* oxidase deficiency (according to Böhm et al. 2006) [5].

Symptoms	Frequency (%)
Encephalopathy	90
Hypotonia	73
Failure to thrive	67
Leigh syndrome	31
Cardiac involvement	24
Hepatopathy	24
Endocrinopathy	5
Renal failure	4

Diagnostics of mitochondrial diseases is demanding. It is necessary to take in account the particular family and personal history, the course of the disease, the comprehensive clinical examination, results of specialized examinations (especially cardiology, visual fundus examination, brain imaging, EMG), laboratory testing of body fluids (lactate, aminoacids, organic acids), and analysis of bioptic samples of muscle, skin, and liver, eventually. Even a normal lactate level in blood does not exclude the possibility of MD, especially in case of milder and later manifesting forms [8]. The gold standard of diagnostics includes the detailed biochemical analyses of OXPHOS complexes activities, substrate oxidation analysis and histological examination of muscle or skin tissue samples. Outcomes of these examinations help tailor targeted molecular genetic testing. If it is not possible to target direct gene sequencing just on the outcomes of above-mentioned laboratory analysis, *next-generation sequencing* technologies come into focus.

2. DISEASES ASSOCIATED WITH MUTATIONS IN MITOCHONDRIAL DNA

As the only exception in the biology of man, mitochondria and OXPHOS are functionally controlled by two genomes: nuclear DNA and mitochondrial DNA. Mitochondrial DNA is inherited exclusivelly maternally [6]. Two key concepts underlying clinical manifestation of the disease caused by mutations in mtDNA are recognised. These are heteroplasmy and threshold level. Each mammalian mitochondrion contains up to 10 mtDNA copies per organelle. Each human cell, except mature erythrocytes, contains hundreds to thousands of mitochondria and, thus, those represent 10^3-10^5 copies of mtDNA. During cellular division, mitochondria are randomly distributed to the daughter cells. The partitioning of mitochondria during cell division, a process called 'replicative segregation', therefore provides a mechanism for unequal distribution of mutated mtDNA. Heteroplasmy stands for mixture of mutant and wild-type mtDNA within each cell. The percentage level of mutant mtDNA may vary among organs and tissues within the same family, and also organs and tissues within the same individual. It may also vary with age. The mutant load of affected tissue is directly related to the severity of the phenotype in some diseases. The threshold effect than represents the level of heteroplasmy, at which the pathogenic mtDNA mutation manifests biochemically and clinically. Correlation between mutation load and severity of clinical features can be illustrated by m.8993 T>G mutation. When the mutation load is around 70-80%, patients manifest with NARP (Neuropathy, Ataxia, and Retinitis Pigmentosa) even in adulthood; whereas infants or children with the mutation load around 90%, present MILS syndrome (Maternally Inherited Leigh syndrome) [9].

2.1. Mitochondrial myopathy, encefalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes syndrome (MELAS)

MELAS is a condition resulting from one of more than 30 casual mutations. However, more than 80 percent of

patients with MELAS have m.3243A>G point mutation of *MT-TL1* gene, which codes mitochondrial tRNA-Leu (UUA/UUG). It results in decreased stability of tRNA-Leu, thus leading to decreased mitochondrial proteosynthesis with combined OXPHOS deficiency. The disorder can manifest at any age. Almost one-half of affected individuals are diagnosed before age of 16 (juvenile form of the disease), neonatal presentation is very rare. The disease manifests usually in tissues with >70% heteroplasmy. In our country with the population of 10 millions, MELAS is the most common multisystem mitochondrial disorder with >50 diagnosed patients [10].

Clinical symptoms of this disorder vary broadly – sensorineural hearing loss, ptosis, epilepsy, muscle weakness and pain, general myopathy, myalgias following exercise, cardiomyopathy, cerebellar symptomatology, severe headaches resembling migraines, repeated stroke-like episodes, and diabetes mellitus. Early symptoms in children, leading to MELAS suspicion, can include failure to thrive, short stature and psychomotoric development delay, particularly if other symptoms are seen in combination. Up to one-half of patients with fully-expressed form of the disease present with stroke-like episodes. The episodes are marked by seizures, visual field sensory loss, at least partially reversible aphasia, hemianopsia, and they are preceded with severe headaches resembling migraines in 70% of patients. Transient hemiplegia and hemianopsia can ensue and last for several hours or weeks, with eventual progress and permament results. Cognitive deficit usually features as mild intellectual disability. Patients with chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO) usually present with progressive paralysis of external eye muscles resulting in limited sidewards or upwards gaze. Patients can suffer with skeletal muscle tiredness and weakness with exercise intoleration, and pain. Additional symptoms can also by psychiatric [11].

Increased blood lactate is found in 50% of patients. CT and MRI scans show stroke-like areas, cerebral and cerebellar cortical atrophies or basal ganglia calcification can also be present. Stroke-like lesions mimicking ischaemic stroke are not always overlapping with areas of cerebral vasculature. Histological analysis if muscle tissue samples mostly reveals non-specific changes, with possible focal subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase (SDH). Succinate dehydrogenase serves as a marker of either mitochondrial proliferation or ragged red fibres (RRF) (fig. 1A, B). Biochemical assessment of mitochondrial function in isolated intact mitochondria from skeletal muscle tissue, reveals OXPHOS complex I, III and IV decreased activities. The final diagnosis is confirmed by molecular-genetic analysis of buccal smear or urine sediment. The administration of L-arginine and/or citrulline during the acute and interictal periods is recommended. It can reduce impairement of vasodilation in intracerebral arteries owing to nitric oxide depletion [10].

2.2. Syndromes associated with large-scale deletion in mitochondrial DNA

Three clinical syndromes associated with single large-scale deletions of mtDNA are progressive external ophtalmoplegia (PEO), Kearns-Sayre syndrome (KSS) and Pearson syndrome. Approximately one-third of patients harbors a „common deletion" of about 5 kilobase (4977 bp), the other have 1.3-10 kb mtDNA deletions [12, 13]. PEO has traditionally featured with ptosis and paralysis of the extraocular muscles (ophthalmoplegia). If some degree of multisystem involvement occurs in PEO syndrome, the syndrome is named as PEO+. Kearns-Sayre syndrome manifests with PEO, typical onset before age 20 years, pigmentary retinopathy, and cardiac conduction block or hyperproteinorrhachia or ataxia. Pearson syndrome was defined as paediatric refractory sideroblastic anaemia associated with exocrine pancreas dysfunction. Clinical presentation of ever-increasing number of patients points to the fact that the three syndroms actually are a continuum of clinical phenotypes, varying from the most severe manifestation with multisystem involvement (Pearson syndrome) to mild, organ-specific forms (isolated ptosis or PEO) [12]. The overall variety of clinical manifestation is extremely broad, including in addition to myopathy exercise intolerance, hearing loss, muscle wasting, muscle pain, ataxia, retinopathy, failure to thrive, diabetes mellitus, migraine, cardiac conduction defects, cardiomyopathy, and hypothyreoidism. Muscle biopsy can reveal characteristic ragged red fibres and increased succinate dehydrogenase (SDH) staining. The diagnosis is usually carried out by detection of mtDNA deletions in buccal smear or cells of urine sediment. No causative therapy is available, patients with AV block profit from pacemaker implantation.

2.3. Leber's hereditary optic neuropathy (LHON)

LHON is by far the most frequent mitochondrial disease affecting about 1:30,000 of the population [14]. More than 150 patients have been diagnosed in the Czech Republic, so far. Pathogenic homoplasmic point mutations of mitochondrial DNA at positions 11778G>A/*MTND4*, 3460G>A/*MTND1* and 14484T>C/*MTND6* decrease the complex I activity and increase the oxidative stress [14].

The disease is characterized by progressive and painless visual deterioration, usually resulting in irreversible blindness. Nonspecific symptoms, such as headache, flashes of light and blurring of vision may preceed [15]. In the vast majority of cases, visual loss becomes binocular, with involvement of the fellow eye either simultaneously or sequentially within 6 – 8 weeks. Visual function usually stabilizes in the chronic phase after the mean of 3.7 months. Visual acuity (0.1 or less) as well as colour discrimination and contrast sensitivity are severely altered; perimetry typically reveals central or caecocentral scotomas with relative sparing of the nasal quadrants (fig. 1C, D) [15]. Minority of patients may present associated features, such as cardiac conduction abnormalities, sensory and motor neuropathies, tremor, ataxia or less commonly basal ganglia lesions (LHON plus).

The disease is typical with its age- and gender-related penetrance, although neither of those may fully predict the individuals in risk of the disease manifestation. The peak age of onset varies between 18-35 years (median onset at 24 years); nevertheless cases presenting at

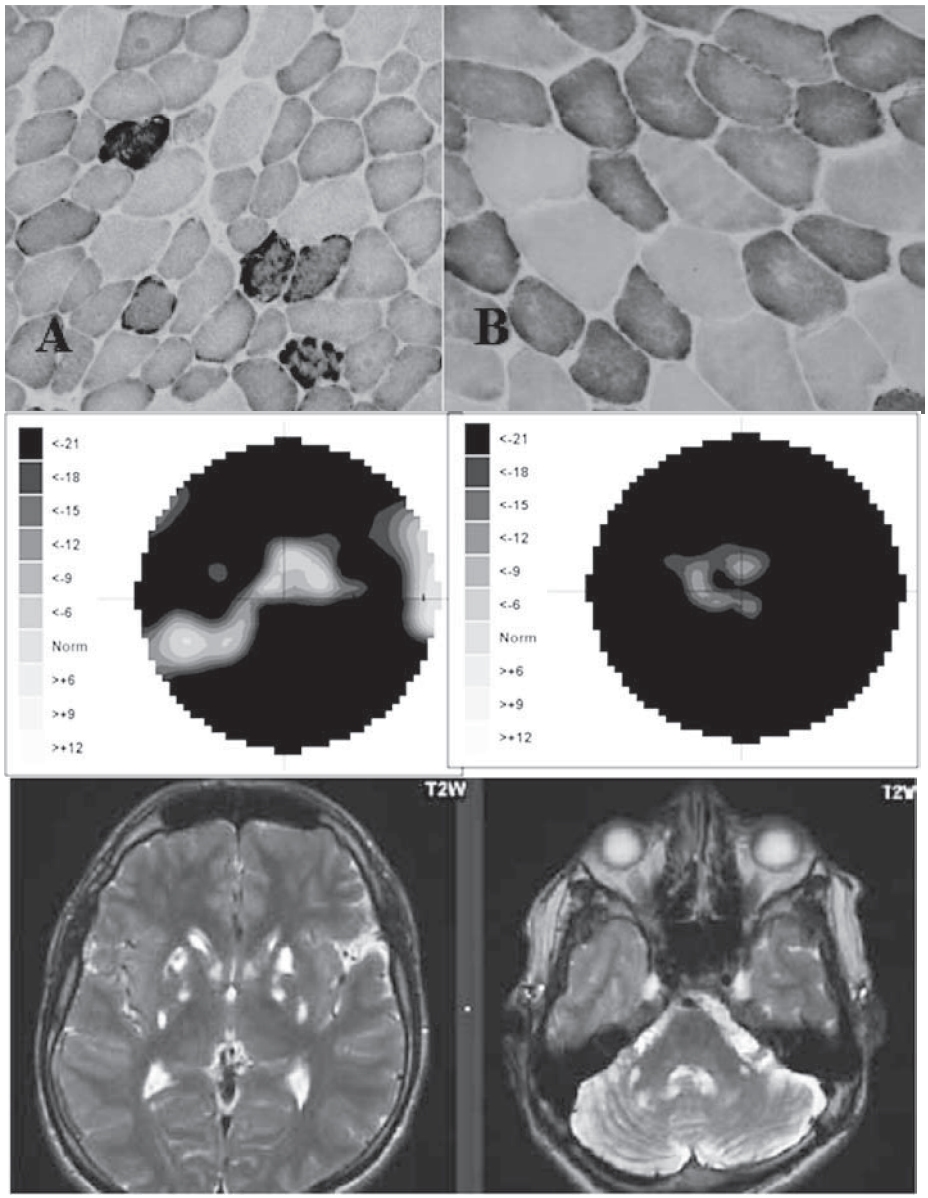


Fig. 1. Laboratory findings in mitochondrial diseases.
A, B) Muscle biopsy of a patient diagnosed with MELAS. A) Ragged red fibres are present (Gomori trichrome stain); B) Cytochrome c oxidase stain showing cytochrome c oxidase negative fibers with decreased cytochrome c oxidase activity, lightly stained Type-1 and darker Type II fibers.
C, D) Automated perimetry obtained from 11-year-old girl with LHON one year after the disease onset. Visual field loss within the central 22°; centrocaecal island extending to the nasal inferior region in the right eye (C) and small central island remains in the left eye (C).
E, F) Brain MRI in boy with Leigh syndrome. E) Bilateral symmetrical hyperintensities of basal ganglia (ncl. putamen, caudate ncl., globus pallidi). F) Cerebellar atrophy and hyperintensity of dentate nuclei of cerebellum and pedunculus cerebelli medius

the age of 1 up to 70 years have been described. Only about 50% males and 10% females are affected [15]. Diagnostic molecular genetic blood testing for three prevalent mutations has to be performed for the diagnosis confirmation. Therapeutic management of LHON is still limited, but recent studies found benefits from quinone analogs (Idebenone) enabling to bypass the complex I defect and exert the antioxidant effect if used during the early phase [16]. Avoidance of agents that may compromise mitochondrial function (smoking, alcohol and certain antibiotics) is highly recommended as is optimization of assistive devices and vision rehabilitation.

3. DISEASES ASSOCIATED WITH MUTATION IN NUCLEAR DNA

Mitochondrial DNA encodes only 13 from approximately 1130-1500 mitochondrial proteins [17]. Many mitochondrial

diseases are thus encoded by nuclear DNA with Mendelian inheritance. Until recently it was generally thought that onset the mitochondrial disorders due to mutations in nuclear genes is in early childhood, whereas disorders caused by mtDNA mutations demonstrate in late childhood or adult life [4, 5]. However, recent advances have shown that many mtDNA disorders are present in childhood, and many nuclear genetic mitochondrial disorders can affect adults.

3.1. Encephalocardiomyopathy with TMEM70 deficiency

The disease was first described in the Roma population, with neonatal onset of the disease and poor prognosis associated with homozygous mutation c.317-2A>G [18]. It represented then very unique finding of nuclear autosomal recessive mutation of OXPHOS, encoding ancillary factor of ATP synthase biogenesis. Later onset and milder course of the disease has been reported recently, including rare cases with normal mental and psychomotor development. Sixty odd patients have been reported so far, with clinical description and laboratory findigs of 48 of these patients being recently reported in multicentre retrospective study [19]. The genetic basis of the disease has been elucidated just recently. The TMEM70 protein plays a role in biogenesis and stabilisation of mitochondrial complex V, ATP synthase [20].

The most frequent symptoms at onset of the disease are early neonatal hypotonia, failure to thrive, cardiomyopathy and metabolic failures (tab. II). Oligohydroamnion, intrauterine growth restriction (IUGR), facial dysmorphism and hypospadias are also common (fig. 2). The succesful management of acute metabolic crises accompanied with lactic acidosis and hyperammonaemia is crucial for prognosis, developement and life expectancy of the child. Metabolic failures can also result in encephalopathy and developmental regression. Common triggers of metabolic crisis can include surgery, acute febrile illness and acute gastroenteritis. Neonatal period is extremely critical for metabolic crisis management, when complicated with heart or respiratory failure and pulmonary hypertension. Stroke-like episodes have not been reported yet. Ten-year survival is 63%, with the most critical neonatal period [19].

Laboratory findings reveal lactic acidosis in combination with hyperalaninaemia, metabolic profile shows specific 3-methylglutaconic aciduria. Estimation of ammonia

Table II. Frequency of the most common symptoms in 48 patients with TMEM70 deficiency (according to Magner et al. 2015) [8].

Symptoms	% of affected patients
Psychomotor delay	98
Hypotonia	95
Faltering growth	94
Metabolic crisis	93
Short stature	89
Cardiomyopathy	89
Prematurity	75
Microcephaly	70
Facial dysmorphy	66
Respiratory failure in neonatal age	54
Hypospadia in boys	50

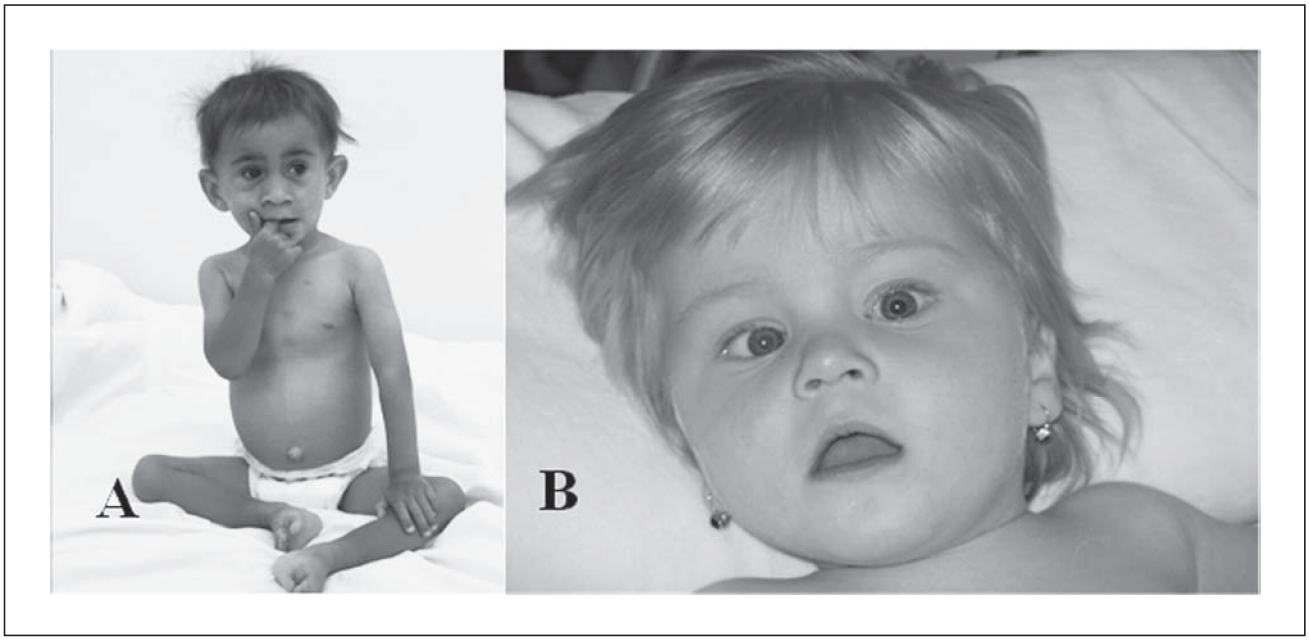


Fig. 2. A) 2.5-year-old boy with TMEM70 deficiency with mild facial dysmorphy, failure to thrive, dystrophy and umbilical hernia. B) 2-year-old girl with SURF1 deficiency with characteristic mild dysmorphy and discoordination of eye movements.

levels is of great importance, and hyperammonaemia should be properly treated during every metabolic crisis or suspicion on the disease.

Most of children require chronic treatment with Na-bicarbonate in possible combination with Shohl's solution (alkalinisation water solution of citric acid and sodium and potassium citrate). Infusion therapy during metabolic crisis involves administration of 10% glucose and lipid emulsion as energy sources. Ammonia scavengers administration should be considered during hyperammonaemia (L-arginine, N-carbamylglutamate), or ammonia elimination using haemodialysis or haemodiafiltration may be taken into account. Long-term management should be tailored to prevent metabolic decompensations and must include frequent feeding, which is of great importance especially during neonatal period and early childhood. The placement of percutaneous gastrostomy may also be used as a method of nutritional support [19].

3.2. Cytochrome *c* oxidase deficiency due to mutations in *SURF1* gene

SURF1 deficiency due to mutations in *SURF1* gene is an autosomal recessively inherited mitochondrial disorder. It is the most frequent cause of Leigh syndrome. SURF1 protein is important for assembly of cytochrome *c* oxidase (COX, complex IV). COX is the fourth complex of the OXPHOS system where sequential electron transfer is coupled to proton pumping, thus generating electrochemical gradient. The electrochemical gradient is then ultimately used to synthesise ATP from ADP and inorganic phosphate, which is carried on in complex V (ATP synthase) [21].

Clinical symptoms in most children with *SURF1* mutations usually start at the end of infancy with attacks of hyperventilation, hypotonia (93% of children), failure to thrive (95%), vomiting, growth retardation and delay of motoric development (88%). Discoordination of eye movements, ophthalmoplegia, hypertrichosis and regression of psychomotor development are usually present in the second year of life (fig. 2), the social communication is usually preserved a little longer [22]. Less frequent symtoms included optic atrophy (23%), seizures or cardiomyopathy (14%). The disease is progressive and eventually leads to respiratory failure. Median survival is about 6 years, only 16% of patients survive 10 years of age.

Lactate level in cerebrospinal fluid (CSF) is increased in most patients. Lactate level in blood is elevated and the ratio between lactate and pyruvate may be increased, but lactataemia may also be normal. EMG shows peripheral neuropathy in most children, ofter accompanied with demyelination, less frequently of axonal form. The activity of COX is low in isolated lymphocytes, cultured fibroblasts and muscle biopsy [21], but the diagnosis is based on detection of pathogenic mutations in *SURF1* gene. The prognosis is poor, no casual therapy is available so far. The metabolic acidosis may be corrected with alkalinisation therapy.

3.3. Cytochrome *c* oxidase deficiency due to mutations in *SCO2* gene

Mutations in the *SCO2* gene are the second most common cause of assembly disorders of COX (respiratory chain complex IV). Clinical symptoms usually start in infancy with hypotonia, encephalopathy, hypertrophic cardiomyopathy and developmental delay. Some children have inspiratory stridor since neonatal period and phenotype resembling infantile spinal muscular atrophy [23]. The onset of the disease is often precipitated by an acute febrile infection, anaesthesia or surgery in more than one half of patients. The course of the disease is progressive with developmental regress and respiratory failure [24].

Children with early onset of the disease may develop severe cardiomyopathy within the first month of life, some children with delayed onset and more attenuated form of the disease can reach the stage of unassisted walking before the onset of regression period. In some children, ptosis, tremour, tongue fasciculation, opisthotonus, dystonia, ataxia, abnormal eye movement, nystagmus or strabism can develop. Atrophy of optic nerve, hearing disorder and seizures are not present. Persistent fever of possible central origin is present in 25% of patients [24]. Prognosis in children with disease onset in early infancy is poor; the mean age upon death is 11.7±7 months [24].

MRI of the brain shows progressive cerebral and cerebellar atrophy. Leigh-like changes can be observed in half of patients. Blood and CSF-lactate levels are increased. Muscle biopsy can reveal decreased COX activity, neuropathic changes with histological pattern resembling spinal muscular atrophy and the COX deficient fibres, but the diagnosis is based on detection of pathogenic mutations in *SCO2* gene. No specific treatment is known.

3.4. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy (MNGIE syndrome)

MNGIE syndrome is an autosomal recessive progressive multisystem disease due to thymidine phosphorylase deficiency and pathogenic mutation in *ECGF1* gene. The enzyme is required for nucleoside homeostasis in mitochondria, the deficiency results in impairment of mitochondrial energetic metabolism. Molecular genetic studies reveal multiple deletions of mitochondrial DNA (mtDNA) [25].

Clinical symptoms usually start in adolescence with reccurent attacks of abdominal pain and gastrointestinal dysmotility and pseudoobstruction due to mitochondrial dysfunction of the intestinal smooth muscle. Patients manifest with nausea, dysphagia, vomiting, early satiety, gastroparesis, borborygms, meteorism, diarrhea, convulsive abdominal pain, and pseudo-obstruction syndrome resulting in cachexia with mean weight loss of 14 kg between the onset of first clinical symptoms and the time of diagnosis [26]. Neurological symptoms are often mild in contrast to severe gastrointestinal problems. Most of patients gradually develop peripheral neuropathy, hearing loss, ptosis and external ophtalmoplegia, and glaucoma-like symptoms. Ultimately, almost all patients present with diffuse leucoencephalopathy visible on MRI. There is no specific treatment, the mean survival is 38 years (26-58 years) [26]. Management for intestinal bacterial overgrowth includes administration of metronidazole and probiotics. Celiac plexus block or lysis was described to

reduce abdominal pain and symtoms of pseudo-obstruction. The therapeutic potential of haematopoetic stem cell transplantation is also under consideration. Adequate nutrition is crucial, home parenteral nutrition is often started.

3.5. Pyruvate oxidation defects

Pyruvate oxidation defects are represented not only by deficiency of protein subunits of the pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) but also by disorders of PDHC regulation. The most common cause of PDHC deficiency are mutations in the *PDHA1* gene, which encode the E1-alpha subunit [27]. Despite the fact that the *PDHA1* gene is located on the X chromosome (Xp22.1), numbers of affected girls and boys are almost equal. This can be explained by different mutation spectrum in boys and girls (mutations occuring in girls can be lethal for boys), and by skewed X-inactivation [27].

Clinical symptoms vary broadly. They represent continuous spectrum covering neonatal onset of the disease with poor prognosis, as well as milder forms with dystonia as a isolated disease manifestation in adulthood [28]. The most common features are developemental delay, epilepsy, neurodevelopement disorders or cerebellar atrophy (tab. III) [29]. Patients can also present with hypotonia, less commonly hypertonia, hearing and visual disorders and failure to thrive. Neurological manifestations includes microcephaly, ataxia, neuropathy, ptosis, dystonia, dystonic hemiplegia and choreoathetoid movements. Epilepsy is particulary frequent, manifesting with spasm and focal seizures. Respiratory dysfunction (Kussmaul breathing, respiratory failure) may occur, especially in children with neonatal-onset of the disease.

Table III. Clinical manifestation of patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency (PDCD). Based on reviwe of 317 PDCD patients (according to Patel et al. 2012) [29].

Symptoms	No of case (% of study population)	Males ratio
Developmental delay	211 (57)	45
Hypotonia/hypertonia	169 (46)	51
Seizures	95 (26)	47
Microcephaly	83 (22)	23
Ataxia	72 (19)	78
Dyspnoe /Kussmaul breathing	51 (14)	59
Dysmorphy	44 (11)	34
Spasticity	38 (10)	34
Neuropathy	26 (7)	88
Optic atrophy	15 (4)	60
Nystagmus	11 (3)	64
Ptosis	9 (2.5)	89
Dystonia	8 (2)	88
Strabism	6 (1.6)	100

Mild craniofacial dysmorphy is more frequent in boys than in girls, with narrow head, head frontal bossing, prominent philtrum, and a depressed flat nasal bridge [30]. Most patients have elevated lactate level in blood with decreased ratio between lactate and pyruvate. Leigh syndrome may be sometimes found also in milder forms of the disease (fig. 1) [31]. Diagnosis can be proved by measurement of PDHC activity in muscle tissue or cultivated fibroblasts, but the diagnosis is based upon molecular-genetic testing, *next-generation sequencing* technologies come into focus.

Ketogenic diet can stimulate fatty acid metabolism, provides an alternative energy source and supplements intermediates missing in PDHC (coenzyme A of Krebs cycle) [32]. In patients with milder forms of the disease, some treatment effects were observed after fast carbohydrates restriction (improved muscle weakness and dystonic disorder) [33]. A very small number of about 5% patients with mutations in the *PDHA1* gene are thiamine-responsive, however, initial therapy with thiamine (50 mg/kg/day) may be indicated especially for those presenting with a dystonic disorder. Dichloroacetate has been used but significant side effects, such as peripheral neuropathy, may limit effectiveness. The benefit of treatment combination of high dose of thiamine and biotin has been established in some patients with thiamine transporters deficiency (SLC19A3) [34]. Metabolic acidosis can be partially compensated using alkalinisation therapy.

3.6. Dominant optic atrophy (DOA) type 1

Nuclear gene *OPA1* encodes one of four large GTPases involved in mitochondrial membrane dynamics and cell homeostasis. Its mutations result in selective loss of retinal ganglion cells exhibiting the same susceptibility to energetic failure at the level of lamina cribrosa that is believed to occur in LHON. The frequency of the disease is 1:30 000 worldwide [35].

Most cases of DOA type 1 manifest in first two decades of life (range 1-69 years) with painless bilateral visual deterioration with the development of generalized dyschromatopsia and central, caecocentral and paracentral scotomas that may remain small and stable over long periods of time [36]. Compared to LHON, the disease progression in DOA type 1 is usually much slower with milder vision loss. Spontaneous visual recovery has never been described in DOA type 1. Oftentimes, DOA type 1 is discovered incidentally in asymptomatic individuals during routine vision testing or as a part of screening of family members of a proband (penetrance 84-88%). Extra-ocular neurological complications in DOA type 1 (DOA plus) have been described in up to 30% of carriers [35] and they may involve sensorineural deafness, ataxia, myopathy, peripheral neuropathy, external ophthalmoplegia, spastic paraparesis and multiple sclerosis-like illness. There is marked clinical variability with the whole spectrum of disease manifestations from unaffected individuals, to DOA type 1 or DOA plus patients within one family segregating one single *OPA1* mutation. Improvement of colour vision, reduction of the central scotoma and increase of visual acuity were described in Idebenone-treated patients with DOA type 1 [37].

4. CONCLUSION

The heterogeneity of mitochondrial disorders is still a challenging task for routine diagnosis. Because of the highly variable phenotypes, the clinical suspicion of a mitochondrial disorder is often delayed, or the disease remains undiagnosed. Although the aimed molecular genetic analyses may be indicated in some of mitochondrial diseases, the methods of next generation sequencing come into focus. The correct diagnosis and adequate treatment can improve prognosis of the patient. Access to genetic counseling is also of great importance.

REFERENCES

1. Soubannier V, McBride HM. Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. Biochim Biophys Acta. 2009;1793:154-170.
2. Feng DF, Cho G, Doolittle RF. Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. Proc Natl Acad Sci. 1997;94:13028-13033.
3. Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF. Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. Am J Hum Genet. 2008;83:254-260.
4. Skladal D, Halliday J, Thorburn DR. Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. Brain 2003;126:1905-1912.
5. Böhm M, Pronicka E, Karczmarewicz E, Pronicki M, Piekutowska-Abramczuk D, Sykut-Cegielska J, et al. Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. Pediatr Res 2006;59:21-26.
6. DiMauro S, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. N Engl J Med. 2003;348:2656-2668.
7. Chinnery PF, Ed. Mitochondrial Disorders Overview. 2010. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/
8. Magner M, Szentiványi K, Svandová I, Ješina P, Tesařová M, Honzík T, et al. Elevated CSF-lactate is a reliable marker of mitochondrial disorders in children even after brief seizures. Eur J Paediatr Neurol. 2011;15:101-108.
9. DiMauro S. A history of mitochondrial diseases. J Inherit Metab Dis. 2011;34:261-276.
10. Dvořákova V, Tesařová V, Honzík T. MELAS syndrom. In Ehler E et al. Vzácná onemocnění. Solen 2014, Olomouc, 44-56. ISBN 978-80-7471-089-6.
11. Magner M, Honzik T, Tesarova M, Dvorakova V, Hansiková H, Raboch J, et al. Psychiatric disturbances in five patients with MELAS syndrome. Psychiatr Pol. 2014;48:1035-1045.
12. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, Bertini E, Carelli V, Comi GP, et al. Redefining phenotypes associated with mitochondrial DNA single deletion. J Neurol. 2015;262:1301-1309.
13. Khambatta S, Nguyen DL, Beckman TJ, Wittich CM. Kearns-Sayre syndrome: a case series of 35 adults and children. Int J Gen Med. 2014;7:325-332.
14. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy - Therapeutic Challenges and Early Promise. Taiwan J Ophthalmol. 2011;1:12-15.
15. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, Sweeney MG, Da Costa J, Harding AE. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. Brain. 1995;118:319-337.
16. Gueven N, Woolley K, Smith J. Border between natural product and drug: comparison of the related benzoquinones idebenone and coenzyme Q10. Redox Biol. 2015;4:289-295.
17. Meisinger C, Sickmann A, Pfanner N. The mitochondrial proteome: from inventory to function. Cell. 2008;134:22-24.
18. Honzík T, Tesarová M, Mayr JA, Hansíková H, Jesina P, Bodamer O, et al. Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. Arch Dis Child. 2010;95:296-301.
19. Magner M, Dvorakova V, Tesarova M, Mazurova S, Hansikova H, Zahorec M, et al. TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. J Inherit Metab Dis. 2015;38:417-426.
20. Cízková A, Stránecký V, Mayr JA, Tesarová M, Havlícková V, Paul J, et al. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. Nat Genet. 2008;40:1288-1290.
21. Piekutowska-Abramczuk D, Magner M, Popowska E, Pronicki M, Karczmarewicz E, Sykut-Cegielska J, et al. SURF1 missense mutations promote a mild Leigh phenotype. Clin Genet. 2009;76:195-204.
22. Wedatilake Y, Brown RM, McFarland R, Yaplito-Lee J, Morris AA, Champion M, et al. SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study Orphanet J Rare Dis. 2013;8:96.
23. Magner M, Veselá K, Honzík T, Ješina P, Vobruba V, Petrák B, *et al.* Mitochondriální encefalomyopatie na podkladě deficitu proteinu SCO2 s obrazem SMA-like neurogenní svalové atrofie - kazuistiky. Ces Slov Neurol Neurochir. 2010;1:73-75.
24. Pronicka E, Piekutowska-Abramczuk D, Szymańska-Dębińska T, Bielecka L, Kowalski P, Luczak S, et al. The natural history of SCO2 deficiency in 36 Polish children confirmed the genotype-phenotype correlation. Mitochondrion. 2013;3:810-816.
25. Honzík T, Tesarová M, Hansíková H, Krijt J, Benes P, Zámecník J, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). Cas Lek Cesk. 2006;145:665-670.
26. Hirano M, Nishigaki Y, Martí R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): A disease of two genomes. The Neurologist. 2004;10:8-17.
27. Cameron JM, Levandovskiy V, Mackay N, Tein I, Robinson BH. Deficiency of pyruvate dehydrogenase caused by novel and known mutations in the E1alpha subunit. Am J Med Genet A. 2004;131:59-66.
28. Bachmann-Gagescu R, Merritt JL 2nd, Hahn SH. A cognitively normal PDH-deficient 18-year-old man carrying the R263G mutation in the PDHA1 gene. J Inherit Metab Dis. 2009;32:Suppl 1.
29. Patel KP, O'Brien TW, Subramony SH, Shuster J, Stacpoole PW. The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. Mol Genet Metab. 2012;106:385-394.
30. Sperl W, Fleuren L, Freisinger P, Haack TB, Ribes A, Feichtinger RG, et al. The spectrum of pyruvate oxidation defects in the diagnosis of mitochondrial disorders. J Inherit Metab Dis. 2015;38:391-403.

31. Magner M, Vinšová K, Tesařová M, Hájková Z, Hansíková H, Wenchich L, et al. Two patients with clinically distinct manifestation of pyruvate dehydrogenase deficiency due to mutations in PDHA1 gene. Prague Med Rep 2011;112:18-28.
32. Gano LB, Patel M, Rho JM. Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. J Lipid Res. 2014;55:2211-2228.
33. Debray FG, Lambert M, Vanasse M, Decarie JC, Cameron J, Levandovskiy V, et al. Intermittent peripheral weakness as the presenting feature of pyruvate dehydrogenase deficiency. Eur J Pediatr. 2006;165:462-466.
34. Subramanian VS, Marchant JS, Said HM. Biotin-responsive basal ganglia disease-linked mutations inhibit thiamine transport via hTHTR2: biotin is not a substrate for hTHTR2. Am J Physiol Cell Physiol. 2006;291:C851–C85910.
35. Yu-Wai-Man, P., Griffiths PG, Burke A, Sellar PW, Clarke MP, Gnanaraj L, et al. The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. Ophthalmology 2010;117:1538-1546.
36. Ferré M, Caignard A, Milea D, Leruez S, Cassereau J, Chevrollier A, et al. Improved locus-specific database for OPA1 mutations allows inclusion of advanced clinical data. Hum Mutat. 2015;36:20-25.
37. Barboni P, Valentino ML, La Morgia C, Carbonelli M, Savini G, De Negri A, *et al.* Idebenone treatment in patients with OPA1-mutant dominant optic atrophy. Brain 2013;136:1-5.

Author's contributions/Wkład Autorów
According to the order of the Authorship/Według kolejności

Conflicts of interest/Konflikt interesu
The Authors declare no conflict of interest.
Autorzy pracy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Received/Nadesłano: 03.11.2015 r.
Accepted/Zaakceptowano: 01.12.2015 r.

Published online/Dostępne online

Address for correspondence:
Prof.MUDr. Jiří Zeman, DrSc.
Department of Paediatrics and Adolescent Medicine
Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2
Czech Republic
tel. +420-224967733
fax +420-224967113
e-mail: jzem @lf1.cuni.cz

Supplement 2]

Magner, M., ***Kolářová, H.****, Honzík, T.*

Pokroky v léčbě dědičných metabolických poruch s neurologickou symptomatologií.

Neurologie pro praxi (accepted).

Pokroky v léčbě dědičných metabolických poruch s neurologickou symptomatologií

Martin Magner, Hana Kolářová, Tomáš Honzík*

Klinika dětského a dorostového lékařství, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

*korespondující autor

Souhrn

V poslední době byl učiněn výrazný pokrok v léčbě dědičných metabolických poruch s primárním biochemickým defektem lokalizovaným v CNS. Článek přináší stručný přehled současných možnosti terapie této skupiny onemocnění zahrnující intratékálně podávanou enzymovou substituční terapii, terapii malými molekulami, transplantaci krvetvorných kmenových buněk a genové terapie. Pro úspěch terapie je zásadní časná diagnostika a nasazení léčby.

Summary

The treatment of the inherited metabolic disorders with primary biochemical defects in the CNS has undergone a considerable progress, recently. Our work brings a brief summary of currently available therapeutic possibilities including intrathecal application of enzyme replacement therapy, small molecules treatment, hematopoietic stem cells transplantation and the gene therapy. For the therapeutic success, the early diagnosis and introduction is crucial.

1. Úvod

Skupina dědičných metabolických poruch (DMP) zahrnuje více než 1000 definovaných onemocnění, z nichž více než tři čtvrtiny postihují i centrální nervový systém (CNS). U části DMP dochází k neurologickému postižení sekundárně, v důsledku metabolické poruchy probíhající mimo CNS, nejčastěji v játrech. Příkladem je vysoká hladina fenylalaninu při neléčené klasické fenylketonurii, hyperamonémie při dekompenzaci některé z poruch cyklu močoviny nebo hypoglykémie u jaterních glykogenóz. Mnoho z těchto onemocnění již dokážeme úspěšně terapeuticky ovlivnit. Jedná se zejména o nutriční opatření: 1) snížením nabídky nedostatečně metabolizovatelných látek (např. nízkobílkovinná dieta u poruchy cyklu močoviny nebo fenylketonurie); 2) náhradou chybějících substrátů (suplementace argininu k biochemické regeneraci cyklu močoviny) nebo naopak 3) odstraněním toxických produktů (podávání benzoátu sodného a fenylbutyrátu, který vyvazuje molekuly amoniaku). Nutné je frekventní podávání stravy, často s přídavkem škrobových preparátů, jakožto prevence

hypoglykémie a katabolického stavu s rizikem metabolického rozvratu. Kromě diety se uplatňuje podávání kofaktorů enzymových reakcí, např. podávání pyridoxinu u deficitu cystathionin-β-syntázy způsobující klasickou homocystinurii nebo tetrahydrobiopterinu u maligní formy fenylketonurie. Důležitá je úprava vnitřního prostředí (např. alkalinizace bikarbonátem sodným u metabolické acidózy) a terapie přidružených příznaků (terapeutické ovlivnění sekundární epilepsie). V poslední době se ve vybraných indikacích stále častěji provádí transplantace jater nebo méně často i jiného orgánu.

Dědičné metabolické poruchy, které svým primárním metabolickým defektem postihují metabolismus nervové tkáně, ať už izolovaně nebo v rámci systémové manifestace, jsou oproti tomu terapeuticky ovlivnitelné mnohem hůře. Poškození CNS je navíc umocněno celou řadou sekundárních patofyziologických procesů, které vznikají na podkladě primárního defektu. Velkou překážku pro aplikaci terapie představuje hematoencefalická bariéra (HEB). Také minimální možnosti dietního ovlivnění a rychlá progrese onemocnění dále přispívají k horší prognóze pacientů. I na tomto poli však dochází zejména v průběhu posledních let k výraznému pokroku. Cílem tohoto stručného přehledu je nastínit současné terapeutické možnosti u vybraných zástupců primárních neurometabolických poruch.

2. Lysosomální střádavá onemocnění

Léčebné možnosti lysosomálních střádavých onemocnění (LSD – lysosomal storage disorders) se poslední dobou výrazně rozrůstají. Jedná se především o náhradu nedostatečné aktivity enzymu rekombinantním preparátem při tzv. enzymové substituční terapii (ERT – enzyme replacement therapy), transplantaci krvetvorných kmenových buněk (HSCT – hematopoietic stem cells transplantation) nebo nejnověji genovou terapii virovým vektorem nesoucím funkční kopii genu. Do terapie malými molekulami můžeme zařadit substrát redukující terapii (SRT) nebo terapii chaperony.

2.1. Enzymová substituční terapie

Principem ERT je náhrada deficitního enzymu jeho rekombinantně připravenou formou vyrobenou v bioreaktorech tkáňových kultur. I když se intravenózní ERT uplatňuje v léčbě LSD již skoro 30 let, jejímu účinku na CNS brání především velikost molekuly podávaného enzymu, který neprostupuje HEB. Uvedený problém lze vyřešit intratékálním podáváním enzymu, nejčastěji cestou míšního kanálu. Bezpečnost takového postupu byla ověřena v I. fázi klinických zkoušek u mukopolysacharidózy (MPS) typ II (Muenzer et al. 2016). V současnosti probíhá fáze I klinického výzkumu u MPS typ I a fáze II/III u MPS typ II.

První nemocí, u které byla nedávno schválená intratékální ERT agenturami EMA a FDA, je pozdně-infantilní forma neuronální ceroidlipofuscinózy typ 2 (NCL2). Výsledky klinických zkoušek ve fázi I/II prokazující stabilizaci progrese onemocnění byly publikované zatím pouze formou přednášky (Markham 2017). Podobný efekt měla terapie i u MPS typ II (Prof. J. Muenzer, osobní komunikace). Jiným způsobem, jak dostat velkou molekulu enzymu přes HEB, je jeho navázání na ligand některého z receptorových přenašečů lokalizovaných na nefenestrovaném endotelu HEB s následným receptorem zprostředkovaným endosomálním transportem. Příkladem jsou rekombinantními enzymy fúzované s monoklonální IgG protilátkou proti lidskému inzulinovému receptoru u MPS typ I a II (fáze I/II).

U aplikace intratékální léčby se nemusí vždy jednat pouze o ERT. Příkladem je intratékálně podávaný 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrinu (HBC), který v nedávno publikované studii u pacientů s Niemann-Pickovou nemocí typu C (NPC) významně zpomalil progresi onemocnění (Ory et al. 2017). Mechanismem účinku HBC je snížení hromadění cholesterolu v lysosomech pomocí AMP-aktivované proteinkinázy indukující autofagii těchto organel (Dai et al. 2017).

2.2. Transplantace krvetvorných kmenových buněk

Transplantace hematopoetických kmenových buněk je v současnosti vyhrazena pouze pro terapii asymptomatických stádií Krabbeho nemoci, infantilní, juvenilní či adultní metachromatické leukodystrofie v časném stadiu a neuronopatických forem MPS I, VI a VII. Principem této terapie je produkce chybějícího enzymu mikroglií, která se diferencuje z kmenových buněk štěpu. Ke stabilizaci postižení CNS dochází za 6-24 měsíců po provedení transplantace. Zásadní z hlediska prognózy onemocnění je brzké načasování terapie, dosažená hladina chimerismu a výsledná enzymová aktivita. U řady onemocnění je přínos HSCT stále nejistý (např. MPS typ II). Nutno uvést, že i když je HSCT léčbou volby i u metachromatické leukodystrofie (MLD), přehledné zhodnocení 30 let po zavedení této terapie stále chybí (Boucher et al. 2015).

2.3. Terapie malými molekulami

Lysosomální střádání lze do jisté míry zmírnit inhibicí syntézy nedegradovatelné molekuly. Na tomto principu funguje SRT. Výhodou SRT je, že se jedná o malé molekuly, které prostupují hematoencefalickou bariérou. Příkladem je miglustat (N-butyldeoxynojirimycin), který kompetitivně inhibuje syntézu glukosylceramidu a glykosfingolipidů. Využívá se v např. léčbě Gaucherovy nemoci nebo Niemannovy-Pickovy nemoci typ C, u které

zpomaluje progresi onemocnění (Wraith et al. 2010). Stabilizace na miglustatu byla pozorována i u některých pacientů s pozdní formou GM2 gangliosidózy. Mezi nežádoucí účinky patří průjmy s možnou ztrátou hmotnosti a třes končetin. Nežádoucí účinky na gastrointestinální trakt jsou mírnější u nového preparátu eliglustat. Syntézu glykosaminoglykanů inhibuje preparát genistein. Při podávání této látky byl pozorován pozitivní efekt na kognitivní funkce a zejména na chování u dětí s MPS typ III (Piotrowska et al. 2008).

Potenciál malých molekul v léčbě LSD je extrémně široký. Tyto látky mohou působit jako kofaktory chemických reakcí, chaperony enzymů nebo mohou ovlivňovat metabolismus vápníku (kurkumin u NPC) či zmírňovat zánět vyvolaný primárním lysosomálním střádáním (L-cykloserin u Krabbeho nemoci, N-acetylcystein u NPC). V širším smyslu lze do této skupiny zařadit i běžnou farmakoterapii užívanou k ovlivnění přidružených příznaků onemocnění. Příkladem je opět NPC: tricyklická antidepresiva na kataplexii, melatonin na poruchy spánku, anticholinergní beta-blokátory či spasmolytika na dystonie a kyselina valproová na křečemi-indukované psychotické příznaky (Klein, Alvarez et Zanlungo 2014).

2.4. Genová terapie

Princip velké většiny v současnosti aplikovaných postupů genové terapie spočívá v dodání funkční genové kopie do postižené tkáně pomocí virového vektoru (např. adenoasociovaný virus-AAV, lentivirus-LV). U LSD s neurologickou manifestací probíhá aplikace nejčastěji intratékálně nebo intracerebrálně. Z celé řady zatím publikovaných výsledků zmiňme např. fázi I/II klinických zkoušek u MPS typ III A s mírným zlepšením chování, spánku a pozornosti nebo zpomalení progrese onemocnění u MPS III typu B (Tardieu et al. 2017). Genové terapie u MPS typu I a II jsou v preklinických fázích; probíhá nábor do studie s genovou terapii u NCL2. I u genové terapie se časné provedení terapie jeví jako zásadní. Dokládá to např. studie devíti dětí s metachromatickou leukodystrofií, u kterých genová terapie stabilizovala progresi onemocnění, pomohla předejít demyelinizaci CNS a její efekt se odvíjel od časového intervalu mezi předpokládaným nástupem onemocnění a provedením terapie (Sessa et al. 2016). Přes výrazný pokrok v této oblasti nebyla genová terapie dosud schválena pro žádné z lysosomálních onemocnění.

2.5. Výzvy v léčbě neurologických projevů u lysosomálních střádavých onemocnění

V důsledku primárního lysosomálního střádání dochází k poruše celé řady buněčných funkcí, např. energetického metabolismu buňky, intra- a extracelulárních signálních cest, endocytózy

a autofagie, endosomální sítě, zánětlivé odpovědi, apod. I když se podaří ovlivnit střádání nedegradovatelné makromolekuly některým z výše uvedených postupů, dopady sekundárních patofyziologických procesů bývají nezvratné. Příkladem je Krabbeho nemoc, kde významnou roli v patofyziologii onemocnění sehrává významná zánětlivá reakce neuronální tkáně vyvolaná primárním střádáním. Zásadním předpokladem pro úspěch terapie je proto časné nasazení terapie, ideálně ještě v preklinickém stadiu onemocnění. I pokud by se však podařilo diagnózu stanovit na základě výsledků novorozeneckého screeningu nebo výskytu onemocnění v rodině, problémem zůstane omezená možnost predikce fenotypu onemocnění. Příkladem může být genotypově-fenotypová korelace u MPS typ II, při které lze postižení CNS odhadnout asi v polovině případů, přičemž spolehlivé biomarkery pro většinu LSD stále chybí.

Otázkou je rovněž postupné zavádění kombinace několika různých terapií (např. ERT a HSCT), které se zatím v praxi uplatňují např. u MPS typ I. Slibným přístupem je aplikace virového vektoru do hematopoetických kmenových buněk pacienta, které jsou mu následně transplantovány (přístup HSC-GT). U tří pacientů s MLD došlo k stabilizaci klinických příznaků a normalizaci enzymové aktivity v likvoru (fáze I/II) (Biffi et al. 2013).

3. X-vázaná adrenoleukodystrofie (X-ALD)

Transplantace krvetvorných kmenových buněk je metodou volby při snaze předejít rozvoji cerebrální formy X-ALD. Podmínkou úspěšnosti je opět včasné provedení HSCT před nástupem příznaků organického postižení CNS, protože ke stabilizaci stavu dochází až za půl roku po transplantaci. Rozhodující pro indikaci je sledování tzv. Loesova skóre, které se vyhodnocuje pomocí pravidelných kontrol magnetické rezonance CNS, a které musí být pod 4 body. U všech pacientů s X-ALD je nutno monitorovat hladiny ACTH a kortisolu pro vysoké riziko rozvoje adrenální insuficience (Engelen Kemp et Poll The 2014).

4. Hereditární neuropatie optiku

Dvěma nejčastějšími zástupci heterogenní skupiny onemocnění postihujících oční nerv jsou maternálně dědičná Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON) a Dominantní optická atrofie (DOA) způsobená mutacemi v genu *OPA1*. Jedinou v současnosti v České republice schválenou léčbou pro LHON je idebenone (Obr. 1). Jedná se o derivát koenzymu Q_{10}, který přenosem elektronů obchází dysfunkční komplex I, snižuje produkci kyslíkových radikálů, a snad i reaktivuje neaktivní retinální gangliové buňky (Lyseng-Williamson,2016). Ve studii došlo k prokazatelnému zlepšení nejlepší korigované zrakové ostrosti, barvocitu a návratu

zrakových funkcí, přičemž žádnému z pacientů se zrakové funkce nezhoršily do pásma praktické slepoty. Efekt terapie byl opět nejvíce u časného nasazení terapie krátce po manifestaci onemocnění (Klopstock et al. 2011). Zlepšení barvocitu a centrální zrakové ostrosti na léčbě idebenonem bylo také pozorováno ve studii pacientů s DOA (Barboni et al., 2013). V ČR však nebyla tato indikace ještě schválena. Slibné výsledky se zlepšením zrakových funkcí přináší rovněž genová terapie pacientů s LHON založená na jednorázové intravitreální injekci rekombinantního AAV 2 nesoucího gen kódující ND4 podjednotku komplexu I (rAAV2-ND4) (Yang et al., 2016). V současnosti probíhá klinická studie fáze III. Na experimentální úrovni je studována celá řada dalších látek ze skupiny aktivátorů biogeneze, modulátorů estrogenových receptorů a α2-agonistů. Terapie hereditárních neuropatií optiku je zajišťována Centrem pro pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku založeném při Všeobecné fakultní nemocnici v roce 2013 (Kolarova et al. 2017).

5. Syndrom mitochondriální myopatie, encefalopatie a iktu podobných příhod (MELAS)

Syndrom MELAS je nejčastěji (v 80 % případů) způsoben patogenní heteroplazmickou mutací 3243A>G v genu *MTTL1* v mitochondriální DNA kódující $tRNA^{Leu}$. Iktu podobné příhody (Stroke-Like Episodes) se objevují u 42 % pacientů (Dvorakova et al. 2016). Mezi nejdůležitější patofyziologické aspekty vzniku SLE patří energetické vyčerpání vedoucí k proliferaci mitochondrií v hladkých svalech a v endotelu cév. Vzniklá mikroangiopatie má za následek lokální poruchu prokrvení a nedostatečnou produkci oxidu dusnatého (NO) s poruchou vasodilatace. Oxid dusnatý vzniká z argininu enzymem NO syntázou (NOS) za vzniku citrulinu a tento se následně v cyklu močoviny recykluje na arginin. Aktivita NOS v enterocytech je u MELAS snížená, a to nejen kvůli snížené funkci enzymů dýchacího řetězce a z ní vyplývající nadprodukce kyslíkových radikálů, které inhibují NOS, ale i z důvodu snížené syntézy citrulinu. Navíc, buněčný stres dále způsobuje i zvýšení dalšího NOS endogenního inhibitoru - dimetylargininu (ADMA) (El-Hattab et al. 2017). Studie s podáváním prekurzorů NO (argininu a citrulinu) prokázaly až trojnásobné zvýšení produkce NO u pacientů s MELAS syndromem (El-Hattab et al., 2016). Intravenózní infuze argininu a perorální podávání citrulinu v interiktálním období vedly k zmírnění klinických projevů a snížení frekvence a tíže následných atak (Koga et al., 2007).

6. Závěr

I když se terapeutické možnosti DMP s neurologickou symptomatologií rozšiřují, zcela zásadním pro úspěch zůstává časná diagnostika. Řadě pacientů s dříve neléčitelným

onemocněním lze významně ulevit od jejich potíží a zlepšit jejich kvalitu života. U každého nově diagnostikovaného pacienta je nutno ověřit aktuální možnosti terapie včetně možnosti zařazení do probíhajících klinických studií. Na druhou stranu je u jednotlivých případů vždy nutno zvážit etické aspekty zahájení mnohdy extrémně náročné léčby. Ta může u pacientů s těžkými nebo rychle progredujícími formami onemocnění vést, namísto požadovaného zlepšení stavu, spíše k dlouhodobému přežívání v závažném stavu s nevratným neurologickým postižením.

Poděkování

Práce byla podpořena grantem AZV 16-32341A a výzkumnými záměry UNCE 204011, RVO-VFN 64165 a PROGRESS Q26/LF1.

Literatura

1. Barboni P, Valentino ML, La Morgia C, Carbonelli M, Savini G, De Negri A, Simonelli F, Sadun F, Caporali L, Maresca A, Liguori R, Baruzzi A, Zeviani M, Carelli V. Idebenone treatment in patients with OPA1-mutant dominant optic atrophy. Brain 2013; 136: e231.

2. Biffi A, Montini E, Lorioli L, Cesani M, Fumagalli F, Plati T, Baldoli C, Martino S, Calabria A, Canale S, Benedicenti F, Vallanti G, Biasco L, Leo S, Kabbara N, Zanetti G, Rizzo WB, Mehta NA, Cicalese MP, Casiraghi M, Boelens JJ, Del Carro U, Dow DJ, Schmidt M, Assanelli A, Neduva V, Di Serio C, Stupka E, Gardner J, von Kalle C, Bordignon C, Ciceri F, Rovelli A, Roncarolo MG, Aiuti A, Sessa M, Naldini L. Science 2013; 341: 1233158.

3. Boucher AA, Miller W, Shanley R, Ziegler R, Lund T, Raymond G, Orchard PJ. Long-term outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for metachromatic leukodystrophy: the largest single-institution cohort report. Orphanet J Rare Dis 2015; 10: 94.

4. Dai S, Dulcey AE, Hu X, Wassif CA, Porter FD, Austin CP, Ory DS, Marugan J1, Zheng W. Methyl-β-cyclodextrin restores impaired autophagy flux in Niemann-Pick C1-deficient cells through activation of AMPK. Autophagy 2017:1-17.

5. Dvorakova V, Kolarova H, Magner M, Tesarova M, Hansikova H, Zeman J, Honzik T. The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers. Mol Genet Metab 2016; 118: 288-95.

6. El-Hattab AW, Emrick LT, Hsu JW, Chanprasert S, Almannai M, Craigen WJ, Jahoor F, Scaglia F. Impaired nitric oxide production in children with MELAS syndrome and the effect of arginine and citrulline supplementation. Mol Genet Metab. 2016; 117: 407-12.

7. Engelen M, Kemp S, Poll-The BT. X-linked adrenaloleukodystrophy: pathogenesis and treatment. Curr Neurol Neurosci Rep 2014; 14: 486.
8. Klein AD, Alvarez A, Zanlungo S. The unique case of the Niemann-Pick type C cholesterol storage disorder. Pediatr Endocrinol Rev. 2014; 12 Suppl 1: 166-75.
9. Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, Rouleau J, Heck S, Bailie M, Atawan A, Chattopadhyay S, Schubert M, Garip A, Kernt M, Petraki D, Rummey C, Leinonen M, Metz G, Griffiths PG, Meier T, Chinnery PF. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain 2011; 134: 2677-86.
10. Koga Y, Akita Y, Nishioka J, Yatsuga S, Povalko N, Katayama K, Matsuishi T. MELAS and L-arginine therapy. Mitochondrion. 2007; 7: 133-9.
11. Kolarova H, Honzik T., Dudakova L., Kousal B., Kulhanek J., Diblik P., Tesarova M., Havrankova P., Forgac M., Zeman J., Liskova P. Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON). Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie 2017 80/113(5), 534-544.
12. Lyseng-Williamson KA. Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Drugs 2016; 76: 805-13.
13. Markham A. Cerliponase Alfa: First Global Approval. Drugs. 2017; 77: 1247-1249.
14. Muenzer J, Hendriksz CJ, Fan Z, Vijayaraghavan S, Perry V, Santra S, Solanki GA, Mascelli MA, Pan L, Wang N, Sciarappa K, Barbier AJ. A phase I/II study of intrathecal idursulfase-IT in children with severe mucopolysaccharidosis II. Genet Med. 2016; 18: 73-81.
15. Ory DS, Ottinger EA, Farhat NY, King KA, Jiang X, Weissfeld L, Berry-Kravis E, Davidson CD, Bianconi S, Keener LA, Rao R, Soldatos A, Sidhu R, Walters KA, Xu X, Thurm A, Solomon B, Pavan WJ, Machielse BN, Kao M, Silber SA, McKew JC, Brewer CC, Vite CH, Walkley SU, Austin CP, Porter FD. Intrathecal 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1-2 trial. Lancet. 2017;S0140-6736: 31465-4.
16. Piotrowska E, Jakóbkiewicz-Banecka J, Tylki-Szymanska A, Liberek A, Maryniak A, Malinowska M, Czartoryska B, Puk E, Kloska A, Liberek T, Baranska S, Wegrzyn A, Wegrzyn G. Genistin-rich soy isoflavone extract in substrate reduction therapy for Sanfilippo syndrome: An open-label, pilot study in 10 pediatric patients. Curr Ther Res Clin Exp 2008; 69: 166-79.
17. Sessa M, Lorioli L, Fumagalli F, Acquati S, Redaelli D, Baldoli C, Canale S, Lopez ID, Morena F, Calabria A, Fiori R, Silvani P, Rancoita PM, Gabaldo M, Benedicenti F, Antonioli G, Assanelli A, Cicalese MP, Del Carro U, Sora MG, Martino S, Quattrini A, Montini E, Di Serio C, Ciceri F, Roncarolo MG, Aiuti A, Naldini L, Biffi A. Lentiviral haemopoietic stem-

cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. Lancet. 2016; 388: 476-87.

18. Tardieu M, Zérah M, Gougeon ML, Ausseil J, de Bournonville S, Husson B, Zafeiriou D, Parenti G, Bourget P, Poirier B, Furlan V, Artaud C, Baugnon T, Roujeau T, Crystal RG, Meyer C, Deiva K, Heard JM. Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. Lancet Neurol 2017; 16: 712-720.

19. Wraith JE, Vecchio D, Jacklin E, Abel L, Chadha-Boreham H, Luzy C, Giorgino R, Patterson MC. Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. Mol Genet Metab 2010; 99: 351-7

20. Yang S, Ma SQ, Wan X, He H, Pei H, Zhao MJ, Chen C, Wang DW, Yuan JJ, Li B. Long-term outcomes of gene therapy for the treatment of Leber's hereditary optic neuropathy. EBioMedicine 2016; 10: 258-68.

Supplement 3]

Kolarova, H., *Krizova, J., Hulkova, M., Hansikova, H., Hulkova, H., Smid, V., Zeman, J., Honzik, T., Tesarova, M.*

Changes in transcription pattern lead to a marked decrease in COX, CS and SQR activity after the developmental point of the 22(nd) gestational week.

Physiol Res 2018 67, 79-91.

[IF: 1,461]

Physiol. Res. 67: 79-91, 2018

Changes in Transcription Pattern Lead to a Marked Decrease in COX, CS and SQR Activity After the Developmental Point of the 22nd Gestational Week

H. KOLAROVA[1], J. KRIZOVA[1], M. HULKOVA[1], H. HANSIKOVA[1], H. HULKOVA[2], V. SMID[3], J. ZEMAN[1], T. HONZIK[1], M. TESAROVA[1]

[1]Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, [2]Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic, [3]Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Received October 29, 2016
Accepted June 19, 2017
On-line November 10, 2017

Summary

Tissue differentiation and proliferation throughout fetal development interconnect with changes in the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) on the cellular level. Reevaluation of the expression data revealed a significant increase in *COX4* and *MTATP6* liver transcription levels after the 22nd gestational week (GW) which inspired us to characterize its functional impact. Specific activities of cytochrome c oxidase (COX), citrate synthase (CS), succinate-coenzyme Q reductase (SQR) and mtDNA determined by spectrophotometry and RT-PCR were studied in a set of 25 liver and 18 skeletal muscle samples at 13th to 29th GW. Additionally, liver hematopoiesis (LH) was surveyed by light microscopy. The mtDNA content positively correlated with the gestational age only in the liver. The activities of COX, CS and SQR in both liver and muscle isolated mitochondria significantly decreased after the 22nd GW in comparison with earlier GW. A continuous decline of LH, not correlating with the documented OXPHOS-specific activities, was observed from the 14th to the 24th GW indicating their exclusive reflection of liver tissue processes. Two apparently contradictory processes of increasing mtDNA transcription and decreasing OXPHOS-specific activities seem to be indispensable for rapid postnatal adaptation to high energy demands. The inadequate capacity of mitochondrial energy production may be an important factor in the mortality of children born before the critical developmental point of the 22nd GW.

Key words

Human fetal development • Mitochondrial biogenesis • Liver • Skeletal muscle • mtDNA

Corresponding author

M. Tesařová, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, Prague 2, 120 00, Czech Republic. Fax: +420 2 24967099. E-mail: marketa.tesarova@lf1.cuni.cz

Introduction

Mitochondrial biogenesis is a target of long-term interest in various physiological or pathological situations, such as endurance training or heart failure (Wallace 1992), with specific attention to its pharmacological modulation (Whitaker *et al.* 2016). However, the functioning of mitochondrial biogenesis during fetal development still represents a highly unexplored field with only a few relevant reports available to date. A better understanding of the molecular mechanisms involved in mitochondrial biogenesis during this extremely dynamic period may help us not only to improve the diagnosis of mitochondrial disorders but also to provide better care to very premature neonates

© 2018 Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

(Wenchich *et al.* 2002, Honzik *et al.* 2008).

Studies on rat models in the early 80s postulated that the activities of respiratory enzymes increase in the course of the human development, and significant differences in activity rate occur between fetal and adult life in both tissue homogenates (Warshaw 1969, Mackler *et al.* 1970, Jakovcic *et al.* 1971, Sordahl *et al.* 1972) and in isolated mitochondria (Jakovcic *et al.* 1971, Pollak *et al.* 1975). We previously showed that the activities of several oxidative phosphorylation system (OXPHOS) enzymes in isolated mitochondria were significantly lower in immature neonates and suggested that the low functional activity of the mitochondria is responsible for their high mortality rate (Wenchich *et al.* 2002, Honzik *et al.* 2008). However, contrary to the previous observations, no positive correlation between OXPHOS activities and gestational age was found (Honzik *et al.* 2008, Pejznochova *et al.* 2010). Moreover, the extensive report on OXPHOS activities in homogenate samples originating from five different human tissues did not show any correlation with the age of gestation (Minai *et al.* 2008).

To explain the regulation of mitochondrial function on a genomic level, we performed a study of the expression pattern of several proteins involved in mitochondrial DNA (mtDNA) transcription and regulation both in human fetal liver and skeletal muscle (Pejznochova *et al.* 2010). The increasing mitochondrial biogenesis as a preparation to postnatal life was demonstrated based on significant changes in mtDNA, mRNA and protein molecular levels throughout the studied period. These results were in accordance with the hypothesis that prenatal preparation leans mainly on a transcriptional level spearheading for more flexible post-transcriptional regulation early after birth (Cuezva *et al.* 1997). Our data, however, were not considered in an organ-specific manner, and it was further indicated that developing tissues, especially liver and skeletal muscle, differ in the control of mitochondrial biogenesis depending on their specific energy demands and the phase of development (Pejznochova *et al.* 2010).

We further examined our expression data (Pejznochova *et al.* 2010) using the quadratic regression model and we revealed a significant increase in *COX4* and *MT-ATP6* transcription levels in the liver after the 22nd gestational week (GW) (Fig. 1). This finding prompted us to further examine enzyme activities in two distinctly developing fetal tissues, liver and skeletal muscle. In the present study, the specific activities of three mitochondrial enzymes, cytochrome c oxidase (COX), citrate synthase (CS), succinate-coenzyme Q reductase (SQR), and mtDNA amount were studied in human fetal tissues between the 14th and 29th GW. Data on COX, CS and mtDNA during the human fetal development were already published in our previous report (Pejznochova *et al.* 2010). In the present work, a different statistical evaluation of enzyme activities is used. To determine whether ongoing liver hematopoiesis (LH) influences our data, we surveyed a consecutive series of fetal livers. Moreover, to determine whether marked changes of transcription capacity will be reflected in mitochondrial function, we decided to divide our results into two specific groups with a 22nd GW limit. To our knowledge, no study has described both OXPHOS and LH mass throughout this particular period.

Methods

Ethics

The work described has been carried out in accordance with the Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) after approval was granted by the Committee of Medical Ethics at the General University Hospital in Prague. Informed consent was obtained for experimentation with human samples.

Material

A set of 25 and 18 samples of human fetal liver and skeletal muscle, respectively, were collected subsequently to the termination of pregnancy for genetic indications unrelated to OXPHOS deficiency (Table 1). Informed consent was obtained from women prior to tissue samples collection. Small blocks of liver and skeletal muscle tissue were taken at autopsy not later than 60 min post-mortem and immediately frozen and stored at -80 °C until used. The fetal gestational age varied from the 13th to 29th GW and there are 1-5 samples from each analysed GW in this period. The same set of liver and muscle samples was already used for our previous analyses (Pejznochova *et al.* 2010). However, in the latter paper, there was enough material for further analyses and the set was larger, including 26 liver and 25 muscle samples. In this paper, another 5 liver samples from GW 16th to 19th were included for additional analysis of hematopoietic activity (Table 1).

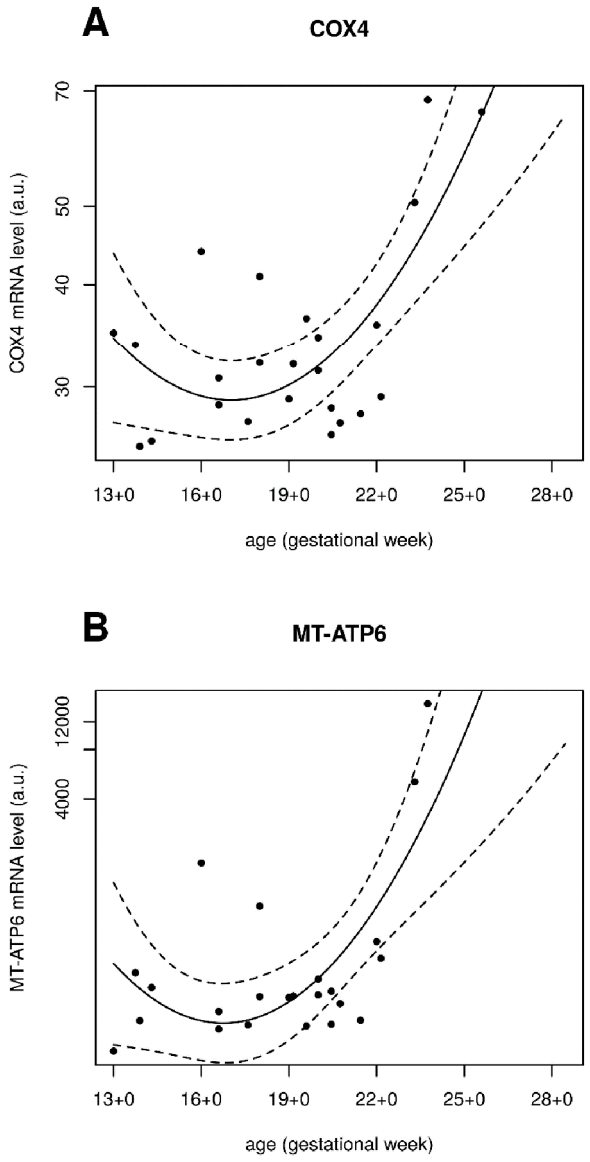


Fig. 1. Expression levels of (**A**) *COX4* and (**B**) *MT-ATP6* mRNA (a.u.; quadratic regression model). In the liver, there was a significant increase in *COX4* and *MT-ATP6* transcription levels after the 22nd week of gestation (p=0.001 and p=0.002, respectively). Adapted from Mrhalkova *et al.* 2010.

Isolation of mitochondria

Mitochondria from the liver and muscle were isolated from 5 % tissue homogenates (w/v) prepared from frozen tissues according to the standard differential centrifugation procedure (Rickwood 1987). STE buffer was used for isolating liver tissue contained 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2 µg/ml aprotinin, and 0.4 µM PMSF, pH 7.4; KTEA buffer for muscles contained 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, and 2 µg/ml aprotinin, pH 7.5 (Makinen and Lee 1968). Freshly isolated mitochondria were used for activity evaluation and the rest of samples was kept at -80 °C for other analyses.

Respiratory enzyme activities

Activities of respiratory enzymes COX, SQR, and CS were measured spectrophotometrically in isolated mitochondria as described elsewhere (Rustin *et al.* 1994). Protein concentration was determined by the method of Lowry *et al.* (1951).

MtDNA content

The quantification of mtDNA was executed by the method previously described in detail by Pejznochova *et al.* (2008).

Hematopoietic mass

Small blocks of liver tissue were fixed in 10 % paraformaldehyde and embedded in paraffin. Serial ultrathin sections (6 µm) were cut and fixed doubly stained with haematoxylin and eosin.

Six representative sections from each fetal liver sample were chosen for light microscopy. The whole area of the section was systematically examined, and every third frame was photographed using stratified sampling method (Hamilton 1995). Five images were taken for each out of 6 sections, which led to a complete yield of 30 images for one fetal liver sample. All photographs were taken under constant conditions at 40× magnification of the objective.

The mass of LH was expressed as a proportion of hematopoietic islands to photographed field of view. The cell surface was quantified as the mean optical density of analysed areas as determined by the densitometric program cellSens Dimension 1.6 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). Vessels and fixation artefacts were excluded from the measurement. Considering mild variations of a preparation thickness and intensity of staining, the program adjustment of density evaluation for each preparation needed to be made.

Statistical methods

Correlation of selected observed variables was examined due to the lack of normality of the data, using a non-parametric Spearman correlation coefficient and a corresponding test of its statistical significance. Differences between groups of subjects were tested by a non-parametric two-sample Wilcoxon test, p-values less than 0.05 were considered as statistically significant. Analyses were conducted using R statistical package, version 3.1.1.

Table 1. List of indications for pregnancy termination in individual fetuses.

No of sample	Liver	Muscle	Gestational age (weeks + days)	Indication for pregnancy termination
1	+	+	13+0	Hygroma colli cysticum
2	+*		13+5	Trisomy 21
3	+		13+6	Trisomy 21
4	+*	+	14+2	Trisomy 21
5	*		15+5	Trisomy 18
6	+		16+0	Intrauterine infection
7	*		16+4	Trisomy 18
8	+		16+4	Trisomy 18
9	+	+	17+4	Meningocele
10	*		17+6	Diaphragmatic hernia
11	+	+	18+0	Trisomy 21
12	+		18+0	Gastroschisis
13	*		18+2	Fluidothorax
14	+*	+	19+0	Spontaneous abortion, oligohydramnion
15	*		19+0	Congenital malformation
16	+*	+	19+4	Trisomy 21
17	+	+	19+4	Trisomy 21
18	+*	+	20+5	Renal agenesis, oligohydramnion
19	+	+	20+0	Unknown
20	+	+	20+1	Sacrococcygeal teratoma
21	+	+	20+3	Intrauterine infection
22	+		20+5	Omphalocele
23	+	+	21+3	Limb deformity
24	+		21+3	Meningocele
25	+*	+	22+1	IUGR, oligohydramnion
26	+	+	22+2	Renal agenesis, oligohydramnion
27	+	+	23+2	Trisomy 21
28	+*	+	23+5	Urinary tract malformation
29	+	+	25+4	Sacrococcygeal teratoma
30	+	+	28+3	Meningocele

No – number, IUGR – Intrauterine Growth Restriction, * – samples used for additional analyses of liver hematopoiesis.

Results

Specific activities of the three mitochondrial enzymes COX, CS, and SQR and the quantity of mtDNA were studied in fetal tissues between 13th and 29th GW. In the present study, compared to previous results (Pejznochova *et al.* 2010), the quantity of mtDNA was positively correlated with the age of gestation only in the liver ($p=0.011$) and not in muscle, a fact we ascribe to the diminution of a sample set and the use of a different statistical evaluation (Fig. 2). To compare the activities of these enzymes in distinctly developing tissues, both liver and skeletal muscle samples were used for the analysis. We recognize that these two tissues represent a heterogeneous population of cell types, and our data need to be considered in this concept.

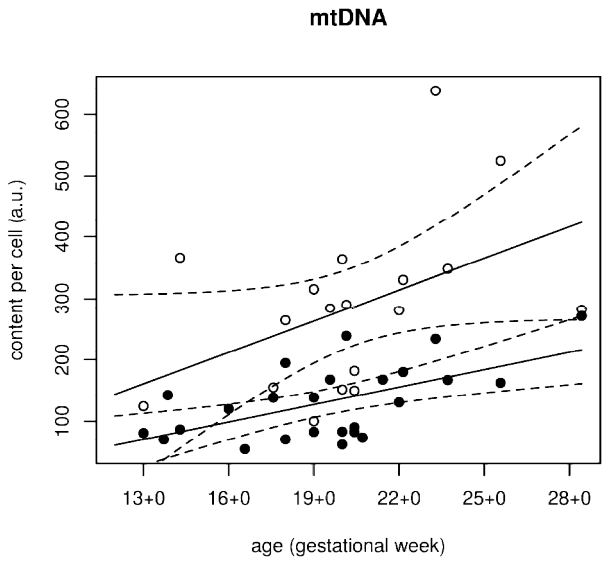


Fig. 2. Time-specific differences in mitochondrial DNA (mtDNA) content per cell (a.u.) in the liver and skeletal muscle (Spearman's correlation). The quantity of mtDNA positively correlated with the age of gestation only in the liver and not in the muscle (p=0.011).

COX, CS and SQR specific activities as a function of gestational age

To determine whether there are age-dependent differences during the human development, the specific activities of COX, CS and SQR were determined in isolated mitochondria. Specific activities of COX were observed in the range of 5.22-580.89 nmol.min^{-1}.mg^{-1} in the fetal liver, and in the fetal skeletal muscle, the range was 20.5-196.2 nmol.min^{-1}.mg^{-1}. Activities of SQR ranged in interval 14.5-273.2 nmol.min^{-1}.mg^{-1} and 5.9-67.4 nmol.min^{-1}.mg^{-1} and for CS, it was 9.37-256 nmol.min^{-1}.mg^{-1} and 15.7-189.7 nmol.min^{-1}.mg^{-1} in liver and muscle, respectively. Although no significant correlation with the age of gestation was observed for all studied enzymes in both prenatal tissues, the profile of enzymatic activities shown in Figure 3 indicates a similar pattern of decreasing specific activity in both tissues. The higher levels were consistently observed in the liver.

Group subdivision at the 22nd GW

According to the pattern of increasing gene expression after the 22nd GW (Fig. 1), this period was chosen as a critical point for a group subdivision. This way, we could evaluate specific activities and their ratios as a dependent variable of changes in the transcription rate. After dividing the data into two subgroups with the 22nd GW age limit, significant differences were revealed both in liver and muscle. The specific activities of COX, CS and SQR showed a significant decrease following the GW 22 in the liver (Fig. 4A, C, E) (p=0.003, p=0.003 and p=0.005, respectively). Activities of both COX and CS in muscle also showed a significant decrease (p=0.003, p=0.034, respectively), but of a lesser magnitude, except for SQR, which did not significantly differ before and after the 22nd GW (Fig. 4B, D, F).

Determination of hematopoietic mass

Hematopoiesis represents an important process that takes place in the developing fetal liver. LH was determined in liver samples of human fetuses at the 14th to 24th GW (Fig. 5). Altogether, 12 samples of the human fetal liver were examined by light microscopy. Twelve ultrathin tissue sections were examined under light microscopy. The amount of hematopoietic mass was expressed as a proportion of hematopoietic cells to the liver tissue.

A significant negative correlation was observed between the LH mass and gestational age (q=-0.602, p=0.042). Stem cells were observed only in the extravascular location; however, the mature cells migrated into the sinusoids and were not included in our evaluation. Hematopoiesis was fully established around the third month, and the hematopoietic islands occupied considerable spaces between the parenchymal cells, altering the architecture of hepatic cords (Fig. 5A). Hepatic blood cell formation declined continually throughout the development from the maximum percentage of 15 % at the outset of the studied period and it was apparent that by the end of the second trimester, hematopoiesis diminished and became only focal (Fig. 5B, C). Unusually high level of LH was found in three patients, which may be due to their primary diagnosis of oligohydramnios (Fig. 5C). Moreover, there was no correlation between OXPHOS specific activities and LH mass (data not shown).

Discussion

Given its extreme time-specific variability, the period of fetal development represents an exciting but rather challenging field. Tissue differentiation and proliferation are interconnected with the changes of metabolism, including OXPHOS on the cellular level. The main objectives of this study were to further characterize several markers of mitochondrial biogenesis throughout the human fetal development with its time and tissue-specific changes.

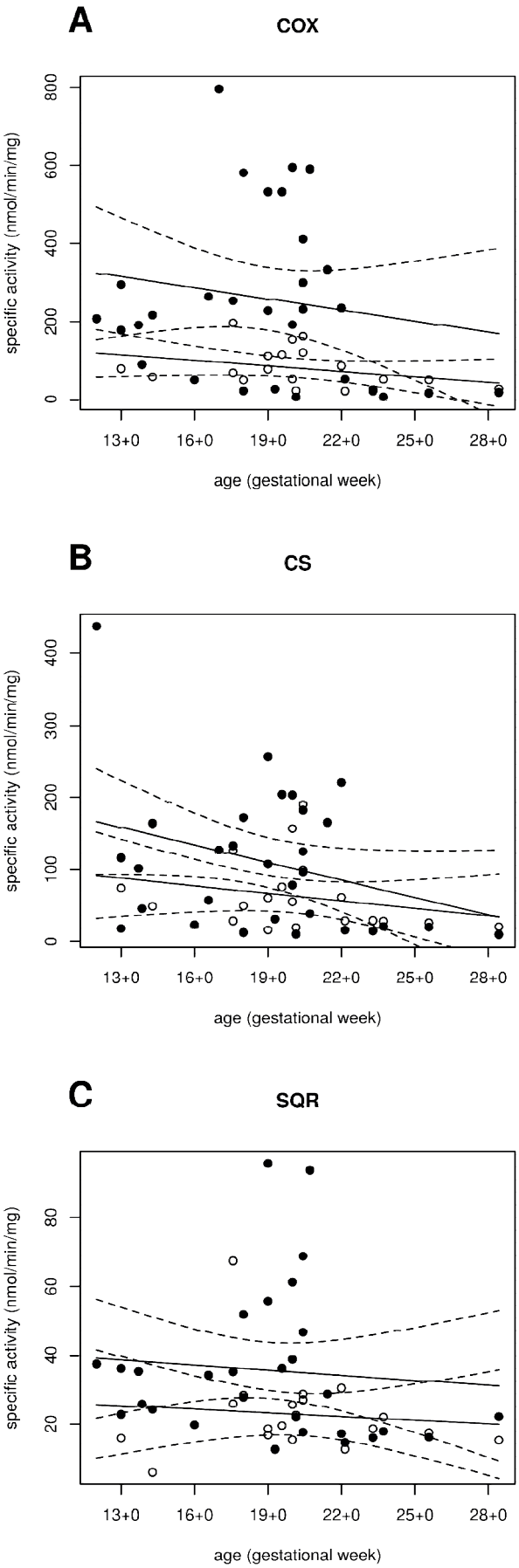


Fig. 3. The relationship between the age of gestation and the enzyme-specific activities (nmol.min^{-1}.mg^{-1}) in mitochondrial fraction (Spearman's correlation). In liver, there was no significant correlation between gestational age and all three cytochrome c oxidases (COX) (p=0.342) (**A**), citrate synthase (CS) (p=0.161) (**B**) and succinate-coenzyme Q reductase (SQR) (p=0.124) (**C**). Insignificant results were also present in the muscle for all COX (p=0.082) (**A**), CS (p=0.216) (**B**) and SQR (p=0.766) (**C**). Black points – liver; blank points – skeletal muscle.

COX is a terminal enzyme of the mitochondrial electron transfer chain determining the functional status of mitochondria. It represents a multicomponent structure with rather complicated biogenesis not only due to its dual genetic origin but also because of the existence of tissue and age-specific isoforms of its subunits (Bonne *et al.* 1993, Rohdich and Kadenbach 1993). The SQR or Complex II is the only complex encoded only by nuclear DNA. Both the tricarboxylic acid cycle and respiratory chain share its enzymatic function; therefore, it is a suitable factor informing us about the overall metabolic function of the cell, including the fatty acid β-oxidation. CS, a mitochondrial matrix enzyme, is one of the three regulatory steps of the tricarboxylic acid cycle and, similarly as SQR, it is frequently used as important normalization factor for OXPHOS enzymatic activities. However, CS seems to be inappropriate for this application when two different organs are being compared, as there exists important inter-tissue variability between its specific activity (Fernandez-Vizzara *et al.* 2011). According to our observations, CS and SQR also seem to be inappropriate normalization parameters or markers of mitochondrial biogenesis within the fetal tissues throughout their development (Fig. 6).

Human mtDNA are self-replicating circular molecules present in mitochondria in variable numbers of copies. MtDNA content is an important marker of mitochondrial biogenesis (Malik *et al.* 2011). It was previously shown that the quantity of mtDNA increases throughout the development (Heerdt and Augenlicht 1990). Early studies on the rat liver (10-21 days of gestation) or bovine heart models (first and third trimester) determined that also COX and SQR activities increased throughout fetal development in tissue homogenate (Jakovcic 1971, Mackler *et al.* 1971, Marin-Garcia 1994) or in isolated mitochondria (Jakovcic 1971, Pollak 1975). Moreover, Marin-Garcia *et al.* later proved that COX activity in the human heart homogenates significantly grows during fetal life (6th to 17th GW) (Marin-Garcia *et al.* 2000).

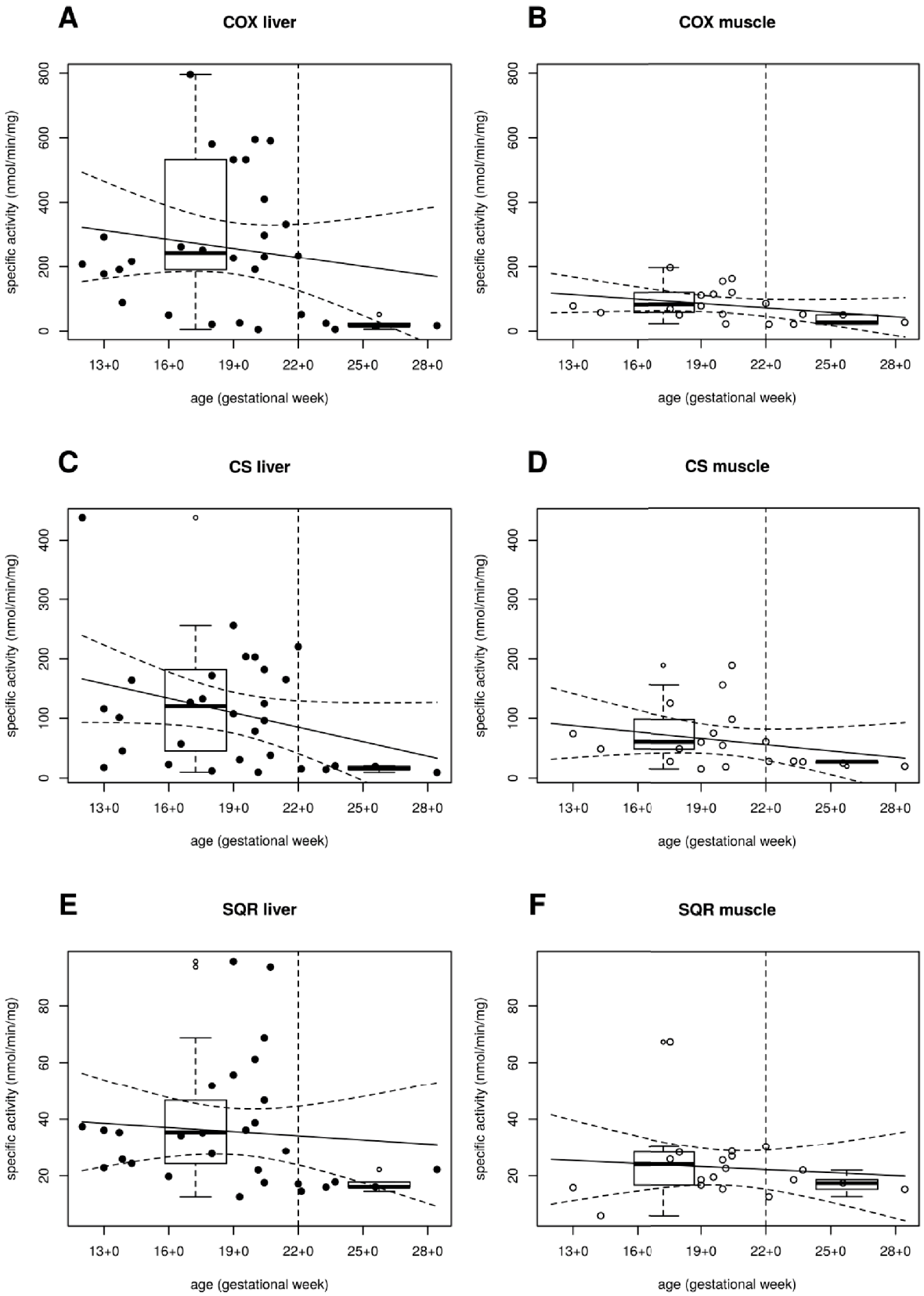


Fig. 4. Tissue-specific differences in COX, SQR and CS enzyme activities (nmol.min^{-1}.mg^{-1}) in isolated liver and muscle mitochondria divided into two groups with a critical point at the 22nd gestational week (GW). In the fetal liver tissue, the specific activities of all studied enzymes, cytochrome c oxidase (COX), citrate synthase (CS) and succinate-coenzyme Q reductase (SQR), presented significant differences between the two categories (Wilcoxon test) (**A**, **C**, **E**). COX was the most age-dependent enzyme with a significant decrease within the groups in the liver (p=0.003) (**A**). Moreover, both CS and SQR demonstrated a similar significant decrease in the liver (p=0.003 and p=0.005, for CS and SQR, respectively) (**C**, **E**). In the muscle, the second group showed significantly lower levels after the 22nd GW for COX (p=0.003) (**B**) and CS (p=0.034) (**D**).

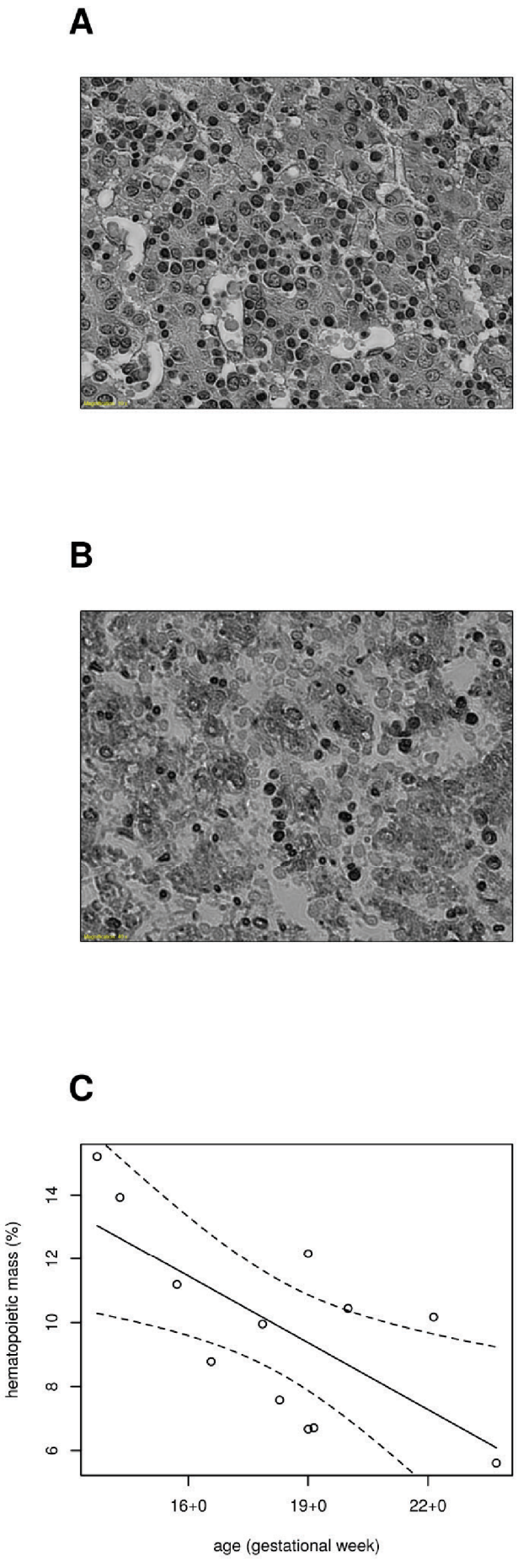


Fig. 5. The hematopoietic mass (%) in 12 liver samples in the course of fetal development from the 14th to 24th gestational week (GW) (Spearman's correlation). hematopoiesis was fully established around the third month and the hematopoietic islands occupied considerable spaces between the parenchymal cells, altering the architecture of hepatic cords (**A**). Hepatic blood cell formation declined continually throughout the development, and by the end of the second trimester, it became only focal, with sparse hematopoietic islands (**B**, **C**). The correlation between hematopoiesis and gestational age presented with a significant negative decrease (q=-0.602, p=0.042) (**C**).

We found no correlation of COX, CS and SQR enzymatic activities with the age of gestation in both human liver and muscle isolated mitochondria within the second trimester of gestation. In both tissues, we observed high variability of enzymatic activities that can be explained by small number of samples in each GW and/or by heterogeneity of clinical conditions that led to pregnancy termination (Table 1). Nevertheless, none of clinical conditions was prevalent in any GW.

Interestingly, following the pattern of increasing gene expression, we could observe similar time-specific changes in both studied tissues after the 22nd GW. Specific activities of COX, CS and SQR were significantly lower in the group following the critical point of the 22nd week of development, although overall, the specific activities were lower in the muscle tissue (Fig. 3). At birth, the full switch from glycolysis to oxidative phosphorylation relies on the mitochondrial biogenesis (Valcarce *et al.* 1994). However, GW 22 to 23 seems to be a limit of viability (Ogawa *et al.* 2013). A profound change in the transcription pattern was observed for several COX subunits (Fig. 1A, Mrhalkova *et al.* 2010) after the 22nd GW, and a similar observation was made for several ATP synthase subunits (Fig. 1B, Mrhalkova *et al.* 2010). The expression level of mitochondrially encoded gene *MT-ATP6* was distinctively increasing after the 22nd GW in both the liver and muscle and a parallel increase of nuclearly-encoded *ATP5G2* was shown in liver, although compared to mitochondrially-encoded genes, levels of both *ATP5G2* and *ATP5O* were four-fold lower (Mrhalkova *et al.* 2010). High levels of mitochondrial mRNAs seem to be a mechanism to compensate the relatively less efficient translation compared to a high nuclear elongation rate, which might be caused by significantly greater ribosomal spacing (Thames *et al.* 2000). Lightowlers *et al.* (1990) suggested that it is either inefficient translation or the rapid turnover of COX8L protein that is responsible for the isoform switch within bovine heart tissue. Similarly, COX6AL destabilization

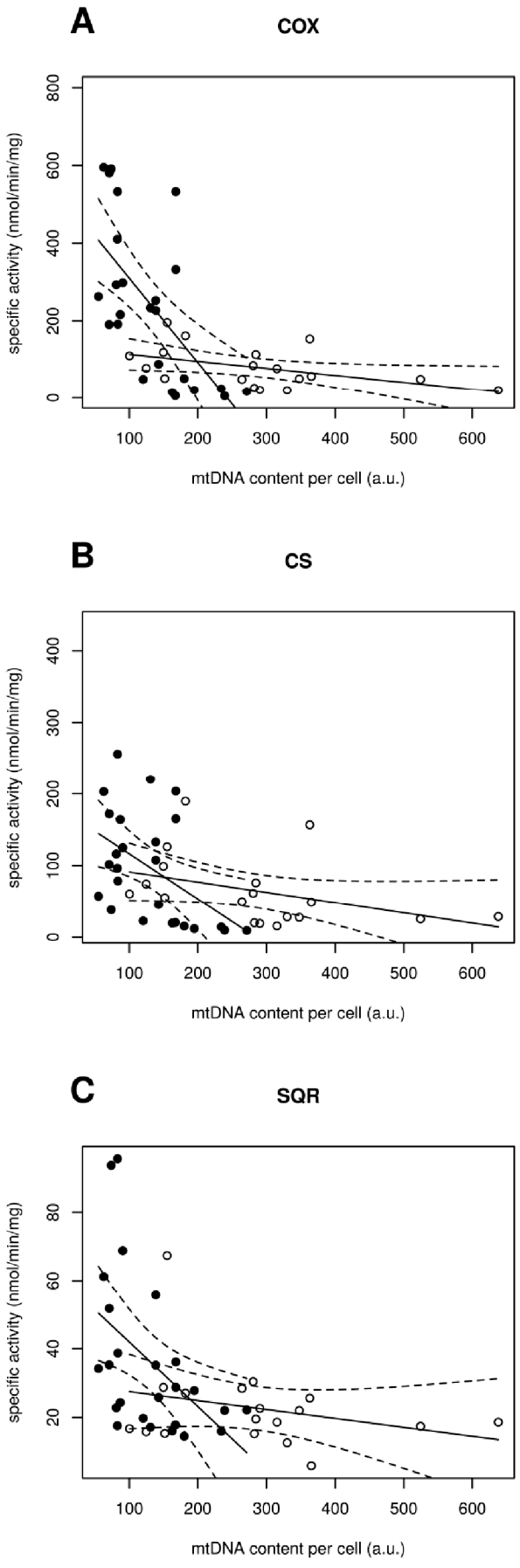


Fig. 6. The correlation between COX-, CS- and SQR-specific activity (nmol.min^{-1}.mg^{-1}) and mtDNA amount (a.u.) in both liver and muscle tissue. There was a significant difference between the studied tissues only for cytochrome c oxidase (COX)-specific activity (p=0.000) (**A**). A significant negative correlation between citrate synthase (CS)-specific activity, and the mitochondrial DNA (mtDNA) content is present in both the liver (p=0.008) and muscle (p=0.049) (**B**). On the contrary, between COX- and succinate-coenzyme Q reductase (SQR)-specific activity and mtDNA amount it was present only in the liver (p=0.000, p=0.010) and not in the muscle tissue (**A**, **C**).

led to increased mRNA degradation within skeletal muscle development. However, other COX subunits that do not undergo isoform switching, such as COX5A, were observed to be relatively stable up to >15-20 h (Thames *et al.* 2000). The accumulation of transcripts must, therefore, be accomplished rather by increased transcriptional rate than the increased half-life of mRNAs (Izquierdo *et al.* 1995b, Ostronoff *et al.* 1996).

It is hypothesized that protein expression in the liver is exerted mainly after birth (Cuezva *et al.* 1997). Similarly, no major difference in protein levels or enzyme-specific activities of all respiratory complexes were noted in the study examining 5 fetal tissues (Minai *et al.* 2008). We could have clearly observed in the liver tissue a marked decrease in COX activity after the 22nd GW. However, at the same time, its transcript levels started increasing. From these inverse processes and considering the stability of COX subunit protein levels throughout the studied period, we can speculate that around the 22nd GW, possibly regulatory changes in COX (OXPHOS) biogenesis are proceeding especially on the posttranslational level.

Based on our results, we suggest that sufficient levels of mtDNA and mitochondrially encoded transcripts that are accumulated throughout gestation but mainly after the 22nd GW are crucial for the adequate onset of respiration after birth. Translational activity reflected in enzyme specific activity would rather stay behind the scene to establish more effective energy production early after birth.

In the work of Pejznochova *et al.* (2010), it was suggested that the fetal liver and muscle differ in the control of mitochondrial biogenesis. The correlation of mtDNA and COX specific activity informed us about the effectiveness of the mtDNA template utilization. We showed that there was a significant difference between liver and muscle when the enzyme specific activity and mtDNA are correlated (Fig. 6A). A significant negative correlation between mtDNA and specific activity of COX is only present in the liver. One can presume that the gene

dosage in the liver may be one of the factors affecting gene expression; however, it does not determine the final COX activity.

This is also supported by the fact that while mtDNA levels are higher in the muscle, the enzyme specific activities are significantly lower in the muscle than in the liver (Fig. 2, Fig. 3A, B, C). These results are in line with the work of Fernandez-Vizzara *et al.* (2011), who suggested that while in adult skeletal muscle, the gene dosage determines COX activity; in other tissues, including the adult liver, other levels of mtDNA expression regulation must have a more relevant contribution to the regulation of the final OXPHOS activity. Nevertheless, it only speaks in favor of the fact that similar mechanisms regulate mitochondrial gene expression in fetal and in adult organisms.

It is evident from our results that all of the studied enzymes follow the same trend. Similarly, the overall activity of CS and SQR did not change throughout the studied period in either liver or muscle, but it was significantly lower in the liver after the 22nd GW. The mitochondrial oxidation of fatty acids plays a critical role in energy metabolism after birth (Oey *et al.* 2005). However, it was only recently proven that β-oxidation is active also during fetal life, as it was long thought that the major energy supply comes from glucose. In the last trimester of intra-uterine life, fat accumulation becomes more important in the human fetus due to its important function in energy storage and temperature maintenance. Some of the deposited fatty acids will accrue from fetal lipogenesis, but the great bulk of fetal lipid is derived from the maternal circulation. This is further supported by observations in the placenta where the activity of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase were inversely correlated with gestational age (Oey *et al.* 2005). In this way, SQR as a more multifunctional enzyme may follow the same trend as other enzymes of the respiratory chain, leaving space for more effective β-oxidation early after birth. We suggest that metabolic pathways work inter-connectively in the organism and that the enzymes of tricarboxylic acid cycle need to develop hand in hand with OXPHOS.

Although differences exist in the regulation of liver and muscle mitochondrial biogenesis, we presume that both tissues need to be prepared for increased energy demands after birth. The study of three cattle muscles suggested that hoofed animals are more mature relative to other mammals, as they get up and start to walk within hours after birth and the development of fast phasic muscle composed of type II glycolytic fibers is more important at birth (Gagniére *et al.* 1999). In a physiologic human neonate, hypertonia is a compensatory mechanism for the change of external conditions and the effect of gravity. Since postural muscles that keep the adequate muscle tonus consist mainly of type I oxidative fibers, rich in mitochondria, a sufficient OXPHOS capacity early after birth becomes crucial. This is further supported by the fact that in preterm infants with immature OXPHOS (Honzik *et al.* 2008), hypotonia is a frequent feature found at birth.

The studied parameters undergo important changes throughout the second trimester, especially in the liver. However, other specialized processes, such as LH, are limited to the fetal period, and their own mitochondrial functional status may be responsible for our observations. Throughout embryonic development, hematopoiesis represents a highly dynamic process, taking place in several different localizations. The blood formation in the human liver begins in embryos of approximately 12 mm in length, i.e. around the 6th GW (Minot *et al.* 1912) and it becomes fully established around the third month of intrauterine life (Zamboni 1965, Brugnara and Platt 2003). In our study, we observed a moderate, continuous decline of LH mass from the 14th to 24th GW, with a maximum of 15 % at the beginning of the studied period (Fig. 5). These results would indicate that participation of hematopoiesis in the overall liver metabolism is rather limited. This is further supported by the fact that hematopoietic cells in fetal liver rely mainly on glycolysis and have both low mitochondrial content and amounts of respiratory chain complexes (Imanirad *et al.* 2013, Simsek *et al.* 2010). Additionally, there were no correlations between OXPHOS-specific activities and LH mass (data not shown). We concluded that the documented developmental changes of respiratory chain enzyme activities are not affected by concomitant hematopoiesis and, above all, reflect processes in liver tissue.

In conclusion, the period of fetal development represents an exciting but rather challenging field. With great developments in perinatal intensive care, the limit of viability was shifted back to GW 22 to 23 (Ogawa *et al.* 2013). A better understanding of the molecular mechanisms involved in mitochondrial biogenesis during this extremely dynamic period may help us in improving diagnostics and in providing better care of very premature neonates (Wenchich *et al.* 2002, Honzik *et al.* 2008).

Within the course of the second trimester, profound tissue-specific changes of mitochondrial energy metabolism are underway. In our study, we observed that specific activities of COX, CS and SQR were significantly lower following the 22nd week of development; however, mtDNA levels continuously increased. These processes seem to be indispensable for rapid postnatal adaption and increasing energy demands. We conclude that the inability of OXPHOS to easily adapt to extrauterine life may be an important factor in the mortality of children born before this critical developmental point.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants GAČR 14-36804G from the Grant Agency of the Czech Republic, by institutional research support from Charles University in Prague (PROGRES Q26/LF1/3, SVV 260367, UNCE 204011) and from the Ministry of Health of the Czech Republic (RVO-VFN 64165). The authors are thankful to Vaclav Capek for the statistical treatment of the data.

Abbreviations

GW – gestational week, LH – liver hematopoiesis, OXPHOS – oxidative phosphorylation system, mtDNA – mitochondrial DNA, COX – cytochrome c oxidase, CS – citrate synthase, SQR – succinate-coenzyme Q reductase.

References

BONNE G, SEIBEL P, POSSEKEL S, MARSAC C, KADENBACH B: Expression of human cytochrome c oxidase subunits during fetal development. *Eur J Biochem* **217**: 1099-1107, 1993.

BRUGNARA C, PLATT OS: The neonatal erythrocyte and its disorders. In: *Nathan's and Oski's Hematology of Infancy and Childhood.* NATHAN DG, ORKIN SK, LOOK AT, GINSBURG D (eds), Saunders Elsevier, Philadelphia, 2003, pp 19-26.

CUEZVA JM, OSTRONOFF LK, RICART J, LÓPEZ DE HEREDIA M, DI LIEGRO CM, IZQUIERDO JM: Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* **29**: 365-377, 1997.

FERNANDEZ-VIZARRA E, ENRIQUEZ JA, PEREZ-MARTOS A, MONTOYA J, FERNANDEZ-SILVA P: Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. *Mitochondrion* **11**: 207-213, 2011.

GAGNIÈRE H, PICARD B, JURIE C, GEAY Y: Comparison of foetal metabolic differentiation in three cattle muscles. *Reprod Nutr Dev* **39**: 105-112, 1999.

HAMILTON PW, ALLEN DC: Morphometry in histopathology. *J Pathol* **175**: 369-379, 1995.

HONZIK T, WENCHICH L, BOHM M, HANSIKOVA H, PEJZNOCHOVA M, ZAPADLO M, PLAVKA R, ZEMAN J: Activities of respiratory chain complexes and pyruvate dehydrogenase in isolated muscle mitochondria in premature neonates. *Ear Hum Dev* **84**: 269-276, 2008.

HEERDT BG, AUGENLICHT LH: Changes in the number of mitochondrial genomes during human development. *Exp Cell Res* **186**: 54-59, 1990.

IMANIRAD P, KARTALAEI PS, CRISAN M, VINK C, YAMADA-INAGAWAA T, DE PATER E, KUREK D, KAIMAKIS P, VAN DER LINDEN R, SPECK N, DZIERZAK E: HIF1α is a regulator of hematopoietic progenitor and stem cell development in hypoxic sites of the mouse embryo. *Stem Cell Res* **12**: 24-35, 2013.

IZQUIERDO JM, RICART J, OSTRONOFF LK, EGEA G, CUEZVA JM: Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* **270**: 10342-10350, 1995.

JAKOVCIC S, HADDOCK J, GETZ GS, RABINOWITZ M, SWIFT H: Mitochondrial development in liver of foetal and newborn rats. *Biochem J* **121**: 341-347, 1971.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.

LUIS AM, IZQUIERDO JM, OSTRONOFF LK, SALINAS M, SANTAREN JF, CUEZVA JM: Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA. *J Biol Chem* **268**: 1868-1875, 1993.

MACKLER B, GRACE R, DUNCAN HM: Study of mitochondrial development during embryogenesis in the rat. *Arch Biochem Biophys* **144**: 603-610, 1971.

MAKINEN M, LEE CP: Biochemical studies of skeletal muscle mitochondria: I. Microanalysis of cytochrome content, oxidative and phosphorylative activities of mammalian skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **126**: 75-82, 1968.

MALIK AN, SHAHNI R, RODRIGUEZ-DE-LEDESMA A, LAFTAH A, CUNNINGHAM P: Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: Accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. *Biochem Biophys Res Commun* **412**: 1-7, 1990.

MARIN-GARCIA J, ANANTHAKRISHNAN R, AGRAWAL N, GOLDENTHAL MJ: Mitochondrial gene expression during bovine cardiac growth and development. *J Mol Cell Cardiol* **26**: 1029-1036, 1994.

MARIN-GARCIA J, ANANTHAKRISHNAN R, GOLDENTHAL MJ: Heart mitochondrial DNA and enzyme changes during early human development. *Mol Cell Biochem* **210**: 47-52, 2000.

MINAI L, MARTINOVIC J, CHRETIEN D, DUMEZ F, RAZAVI F, MUNNICH A, ROTIG A: Mitochondrial respiratory chain complex assembly and function during human fetal development. *Mol Genet Metab* **94**: 120-126, 2008.

MINOT CS: Development of the blood, the vascular system and the spleen. In: *Manual of Human Embryology*. KEIBEL F, MALL FP (eds), J. B. Lippincott, Philadelphia, 1912, pp 498-534.

MRHALKOVA A: Study of Expression and Maturation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System During Mammal's Prenatal Period; Diploma Thesis of Charles University, Prague 2010.

OEY NA, DEN BOER ME, WIJBURG FA, VEKEMANS M, AUGE J, STEINER C: Long-chain fatty acid oxidation during early human development. *Pediatr Res* **57**: 755-759, 2005.

OGAWA M, MATSUDA Y, KANDA E, KONNO J, MITANI M, MAKINO Y: Survival rate of extremely low birth weight infants and its risk factors: case-control study in Japan. *ISRN Obstet Gynecol* **2013**: 873563, 2013.

OSTRONOFF LK, IZQUIERDO JM, ENRIQUEZ JA, MONTOYA J, CUEZVA JM: Transient activation of mitochondrial translation regulates the expression of the mitochondrial genome during mammalian mitochondrial differentiation. *Biochem J* **316**: 183-191, 1996.

PEJZNOCHOVA M, TESAROVA M, HONZIK T, HANSIKOVA H, MAGNER M, ZEMAN J: The developmental changes in mitochondrial DNA content per cell in human cord blood leukocytes during gestation. *Physiol Res* **57**: 947-955, 2008.

PEJZNOCHOVA M, TESAROVA M, HANSIKOVA H, MAGNER M, HONZIK T, VINSOVA K, HAJKOVA Z, HAVLICKOVA V, ZEMAN J: Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development. *Mitochondrion* **10**: 321-329, 2010.

POLLAK JK: The maturation of the inner membrane of foetal rat liver mitochondria. *Biochem J* **150**: 477-488, 1975.

RICKWOOD D: Isolation and characteristics of intact mitochondria. In: *Mitochondria: A Practical Approach I.* WILSON MT, DARLEY-USMAR VM (eds), IRL Press, Oxford, 1987, pp 1-16.

ROHDICH F, KADENBACH B: Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase efficiency by nucleotides. *Biochemistry* **32**: 8499-8503, 1993.

RUSTIN P, CHRETIEN D, BOURGERON T, GERARD B, ROTIG A, SAUDUBRAY JM, MUNNICH A: Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* **228**: 35-51, 1994.

SIMSEK T, KOCABAS F, ZHENG J, DEBERARDINIS RJ, MAHMOUD AI, OLSON EN, SCHNEIDER JW, ZHANG CC, SADEK HA: The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **7**: 380-390, 2010.

SORDAHL LA, CROW CA, KRAFT GH, SCHWARTZ A: Some ultrastructural and biochemical aspects of heart mitochondria associated with development: fetal and cardiomyopathic tissue. *J Mol Cell Cardiol* **4**: 1-10, 1972.

VALCARCE C, IZQUIERDO JM, CHAMORRO, CUEZVA JM: Mammalian adaptation to extrauterine environment: mitochondrial functional impairment caused by prematurity. *Biochem J* **303**: 855-862, 1994.

WALLACE DC: Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* **256**: 628-632, 1992.

WARSHAW JB: Cellular energy metabolism during fetal development. I. Oxidative phosphorylation in the fetal heart. *J Cell Biol* **41**: 651-657, 1969.

WENCHICH L, ZEMAN J, HANSIKOVA H, PLAVKA R, SPERL W, HOUSTEK J: Mitochondrial energy metabolism in very premature neonates. *Biol Neonate* **81**: 229-235, 2002.

WHITAKER RM, CORUM D, BEESON CC, SCHNELLMANN RG: Mitochondrial biogenesis as a pharmacological target: a new approach to acute and chronic diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **56**: 229-249, 2016.

ZAMBONI L: Electron microscopic studies of blood embryogenesis in humans. II. The hemopoietic activity in the fetal liver. *J Ultrastruct Res* **12**: 525-541, 1965.

Supplement 4]

Hulkova, M., Krizova, J., ***Kolarova, H.****, Berankova, K., Zeman, J., Hansikova, H., Tesarova, M.*

Sex differences in mtDNA content and its effect on mitochondrial enzyme activities in the context of human skeletal muscle aging.

Aging Dis (submitted)

Title: Sex differences in mtDNA content and its effect on mitochondrial enzyme activities in the context of human skeletal muscle aging

Authors: Martina Hůlková, Jana Křížová, Kamila Beránková, Hana Kolářová, Jiří Zeman, Hana Hansíková, and Markéta Tesařová

Institutions: Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague

Corresponding Author: Markéta Tesařová, PhD, Charles University, First Faculty of Medicine, Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Ke Karlovu 2, Prague 2, 120 00 Czech Republic

Phone: +420-2-24967748

Fax: +420-2-24967099

e-mail: marketa.tesarova@lf1.cuni.cz

Running Title: MtDNA content in human skeletal muscle aging

Abstract

The mitochondrial functional state is assessed mainly by respiratory chain enzyme activities, especially in routine diagnostics. The coupling of mitochondrial DNA content with enzyme activity could provide a more integrated view of the state. However, the context of age and gender is necessary to include in the view. The main aim of this study was to analyze mtDNA content during aging and then to compare differences between males and females in a set of 205 human skeletal muscle. In the next step, we investigated the relationship between mtDNA content and the enzyme activities of COX, CS and SQR. The analysis was performed in both tissue homogenate and mitochondrial fraction. Sex differences that occurred with aging were revealed in the mtDNA-normalized activities.

Key words: mtDNA content, cytochrome c oxidase, age, sex differences

Introduction

Mitochondrial DNA (mtDNA) as is extra-chromosomal DNA template is present in mitochondria in variable numbers of copies per cell. At present, we know that the copy number depends mainly on tissue type and age [1-3]. MtDNA content is a useful biomarker of mitochondrial biogenesis [4, 5] and corresponds with organelle number in animal cells [6]. We previously demonstrated [2] a significant correlation between age and the molecular levels (mtDNA, mRNA or protein) that correspond to mitochondrial biogenesis in human fetal liver and muscle. Additionally, a gender-specific effect might play an important role in the mitochondrial control of aging. The sex-dependent differences in mitochondrial physiology are thought to contribute to the longer life expectancy of women [7]. Estradiol upregulates mitochondrial biogenesis through nuclear respiratory factor 1 (NRF1) [8], and estrogens most likely serve as a regulator of respiratory complex III activity [9].

The cytochrome c oxidase (COX) and citrate synthase (CS) enzyme activities are the most often used biochemical parameters for assessing the functional status of mitochondria. The next important parameter is represented by succinate-coenzyme Q reductase (SQR) activity. SQR is the only enzyme that participates in both the tricarboxylic acid cycle and the electron transport chain [10]. Both CS and SQR activities are commonly used as normalization parameters for the respiratory chain (RC) complex activities and markers of mitochondrial mass. All SQR subunits are exclusively encoded by nuclear DNA. In a limited number of studies, no significant differences in SQR activity were found during aging in muscle mitochondria (Barrientos et al., 1996). The CS gene, encoded by nuclear DNA, is a direct target for retinoic acid receptor-related orphan receptor α (RORα), which plays an important role as a transcription factor in the

regulation of circadian rhythm and metabolism [11]. RORα regulates lipid metabolism through the regulation of CS expression [12]. Age-dependent changes in CS activity have been demonstrated in tissue homogenates and mitochondrial suspensions [13, 14]. A significant increase in CS activity was found between the fetal and postnatal phase in muscle mitochondria [2]. However, regardless of age, sex-dependent differences in CS activity were not observed in either subsarcolemmal mitochondria or a myofiber homogenate [13, 15].

In mammals, COX is composed of 14 protein subunits containing several metal prosthetic sites [16, 17]. Eleven subunits are nuclear in origin, and three catalytic core subunits (MTCO1, MTCO2, and MTCO3) are encoded by mtDNA. COX genes are regulated by the nuclear respiratory factors NRF1 and NRF2, by mitochondrial transcription factor A (TFAM) [18]. During human development from the fetal to postnatal phase, a significant increase in COX activity was observed in muscle mitochondria [2]. COX activity did not change significantly with aging in either isolated mitochondria or a muscle homogenate [19, 20]. However, COX activity in subsarcolemmal mitochondria was lower in women compared to men, and an age-related decrease was observed in a set of 42 patients between 20 and 92 years old [13].

A sufficient number of studies focused on the relationship between mtDNA content and gender or changes in enzyme activity is missing. The study of Gaignard et al. 2015 demonstrated the importance of the gender in muscle tissue when they showed that ageing affects RC function only in men [21]. A recently published study on the relationship between mtDNA content and RC complex activities suggested that gene dosage could be a relevant parameter determining COX activity in rat skeletal muscle [3], and mtDNA content should be considered an important normalization factor similar to CS activity. According to our previous results, age is also an essential factor for the final evaluation of the mitochondrial functional state [2].

The aims of the present study were to analyze mtDNA content during aging and then to compare differences between males and females. In the next step, we focused the study on characterization the relationship between mtDNA content and the enzyme activities of COX, CS and SQR in the context of gender and age. Finally, correlations between mtDNA content and COX or CS activity from tissue homogenate and the mitochondrial fraction from skeletal muscle were analyzed. The study was conducted in a large set of human skeletal muscle tissue samples collected for mitochondrial disease diagnostics during the past five years.

Materials and Methods

Material

The study involved 205 skeletal muscle tissue samples (107 males and 98 females), which were obtained from individuals between 2 weeks and 78 years of age. All the samples were collected from individuals suspected of mitochondrial disease that was subsequently ruled out due to normal respiratory chain activities.

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and was approved by the Committee of Medical Ethics at the General University Hospital in Prague. Informed consents were obtained from patients or their parents prior to tissue biopsy.

Tissue homogenization and isolation of mitochondria

The muscle tissue (300–500 mg) was homogenized on ice in isolation buffer (1:20 wt/vol). KTEA buffer for muscles contained 150 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, and 2 μg/ml

aprotinin, pH 7.5. Tissue was minced by precooled scissors and homogenated using a Potter-Elvehjem polytetrafluoroethylene/glass homogenizer. Skeletal muscle mitochondria were isolated according to standard differential centrifugation procedures [22]. The tissue homogenate was centrifuged at 600 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was filtered through nylon netting, decanted into a precooled centrifuge tube and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4 °C. The mitochondrial pellet was resuspended in a half-volume of fresh buffer and centrifuged again at 10,000 g for 10 min. The final mitochondrial pellet was resuspended in 25 µl of fresh buffer per 100 mg of tissue. From each sample, fresh aliquots of homogenate and isolated mitochondria were used for activity determination, and aliquots of all samples were stored at −80 °C for other analyses. Protein concentration was determined by the Lowry method [23].

Enzyme activity assay

The activities of CS and COX were measured spectrophotometrically in both homogenates and isolated mitochondria from skeletal muscle as described elsewhere [24, 25]. The activity of SQR (succinate:coenzyme Q10 reductase) was measured only in the mitochondrial fraction [25]. Briefly, SQR activity was measured by incubating 20 µg of mitochondrial extract in 1 ml of assay medium (10 mM potassium phosphate, pH 7.8, 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 0.3 mM KCN, 10 mM succinate, 3 µM rotenone, 0.2 mM ATP, 80 µM 2,6-dichloroindophenol, 1 µM antimycin and 50 µM decylubiquinone). A decrease in absorbance at 600 nm due to the reduction of 2,6-dichloroindophenol was monitored. SQR activity was expressed as nmol/min/mg protein using a molar absorption coefficient of ε_{600}=20.6/mM/cm.

COX activity was measured by incubating 20 µg of mitochondrial protein or 40 µg of tissue homogenate protein in 1 ml of assay medium (40 mM potassium phosphate, pH 7.0, 1 mg/ml

BSA, 25 μM reduced cytochrome c and 2.5 mM n-dodecyl β-D-maltoside), and the oxidation of cytochrome c was monitored at 550 nm. COX activity was expressed as nmol/min/mg protein using a molar absorption coefficient of ε_{550}=19.6/mM/cm.

CS activity was determined with 20 μg of mitochondrial protein or 40 μg of tissue homogenate protein in a medium containing 0.1 M Tris–HCl, 0.1 mM 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), and 50 μM acetyl coenzyme A, pH 8.1. The reaction was started by adding 0.5 mM oxaloacetate, followed by monitoring changes at 412 nm for 1 min. The data were corrected for the absorbance change without oxaloacetate. CS activities were expressed as nmol/min/mg protein using a molar absorption coefficient of ε_{412}=13.6/mM/cm.

DNA analysis

Total DNA was extracted by standard phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation or using a QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. DNA was stored at 4°C. The quality and concentration of total DNA was checked by NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Large mtDNA deletions were excluded in each sample by amplifying whole mtDNA (LX-PCR) with the use of Takara LA Taq Polymerase and two different sets of primers [26].

qPCR

qPCR was performed in 20 μl reactions containing 2X Master Mix DyNAmoTM HS SYBR® Green (Finnzymes), 200 nM of each primer and 1 μl of DNA template. The concentration of each analyzed DNA sample was 50 ng/μl. The thermal cycling conditions were 95°C for 15 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, target-specific annealing temperature and time [2] and

72°C for 30 s. The subsequent steps were 72°C for 5 min, a melting curve from 72°C to 92°C (fluorescence reading every 1°C/10 s) and 72°C for 10 min. The data were collected using a Chromo4 real-time PCR system (Bio-Rad).

Ten-fold serial dilutions of the genomic DNA (from 100 ng to 10 ng) from liver or muscle tissue were included in each run to generate a calibration curve. The slope of the calibration curve reflected the reaction efficiency. No significant difference between efficiencies of phenol/chloroform-extracted DNA and DNA isolated using the QIAamp DNA mini kit was detected. All samples were analyzed twice in triplicate for each gene. Occasionally, one point from a particular triplet was rejected if it deviated significantly from the trend line. An analysis of reaction specificity was provided by the melting curve analysis and electrophoresis.

Analysis of mtDNA content

To quantify the mtDNA content, we amplify mitochondrial targets [4] relative to GAPDH as a nuclear target [2]. The nuclear target was used to quantify nuclear DNA, and therefore normalization of the mtDNA content per cell was accomplished. The equation described in Pejznochova et al. (2010) was applied to express mtDNA content as mtDNA level per cell. Sensitivity was determined by the Cq values that were plotted as a function of the DNA content (in nanograms), and then the limits of quantification and detection were assessed [2].

Statistical analysis

Cqs were calculated with Opticon 3 Software (Bio-Rad). The baseline value was the average fluorescence value over a cycle range of 3 (n_{Ct}-2; n = number). A Shapiro-Wilk test, Spearman's correlation, Wilcoxon test and Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA were used to evaluate

the relationships among mtDNA content, enzyme activities and age. The results were considered significant when the corresponding $P < 0.05$.

Results

We measured mtDNA content in a set of 205 skeletal muscle samples from individuals in whom mitochondrial disease was not confirmed. In the next steps, the specific enzyme activities were analyzed and normalized to mtDNA content in context of age and gender. Furthermore, the analysis compared the normalized enzyme activities and enzyme activities without normalization during aging of men and women.

Moreover, analyses of correlations between mtDNA content and skeletal muscle enzyme activities were performed in two different sample preparations – homogenate (COX and CS) and mitochondrial fraction (COX, CS and SQR). The activity of SQR was measured only in the mitochondrial fraction because of a limited amount of sample material. For 93% of the samples, all biochemical and molecular results were available.

Sex differences in mtDNA content during aging and its effect on the normalized CS, COX and SQR enzymatic activities in the skeletal muscle

The set of 205 samples was divided into four groups according to age (0-10 y; 11-20 y; 21-40 y and 41-78 y) and gender. The enzymatic activities (CS, COX and SQR) in the mitochondrial fraction were normalized to mtDNA content. Then, the differences in enzymatic activity or normalized activity were analyzed among the age and gender groups.

We analyzed mtDNA content in the same age groups for both males and females. The male mtDNA level in skeletal muscle showed significant dependency on the age group ($p = 0.001$) (Figure 1). A significant difference was found among boys up to 10 years of age and the other male groups (0 – 10 vs. 11 – 20: $p = 0.001$; 0 – 10 vs. 21 – 40: $p = 0.005$; 0 – 10 vs. 41 – 78: $p = 0.005$). The female mtDNA content per cell did not vary with age group ($p > 0.05$) (Figure 1). Spearman's correlations between age and mtDNA content were significantly positive in both genders, although the male group showed a more distinct correlation ($r = 0.626$; $p = 0.001$) than the female group ($r = 0.275$; $p = 0.008$) (data not shown). Therefore, these results indicate that mtDNA content changes during aging in a gender-specific manner. No significant differences were detected between the males and females when the same age groups were compared (Wilcoxon test: $p > 0.05$ for all tested groups).

The normalized activities of CS, COX and SQR in females were not dependent on the age group (Kruskal-Wallis test: p(CS) = 0.078, p(COX) = 0.349, p(SQR) = 0.302) (Figure 2 – B, D, F). The data did not show any trend with age. On the other hand, the normalized activities of all three enzymes (CS, COX and SQR) in males were significantly dependent on the age group (Kruskal-Wallis test: p(CS) = 0.010, p(COX) = 0.005, p(SQR) = 0.013) (Figure 2 – A, C, E). The data show an interesting decrease with age in normalized specific activity. This trend is the most striking in the normalized COX activities, where the only significant difference was detected between the youngest males (0-10 y) and middle-aged males (21-40 y) ($p = 0.044$) (Figure 2 - C).

In both the male and female groups, no significant age group dependency was detected in the unnormalized enzymatic activities of CS, COX and SQR (Kruskal-Wallis test: p(CS) = 0.081,

p(COX) = 0.068, p(SQR) = 0.137 in males; p(CS) = 0.637, p(COX) = 0.394, p(SQR) = 0.197 in females) (supplementary material a).

The CS, COX and SQR activities were not age group-dependent (Kruskal-Wallis test: $p > 0.05$) (data not shown), but the normalized activities depended significantly on the age group (Kruskal-Wallis test: p(CS) = 0.002; p(COX) = 0.014; p(SQR) = 0.023) (supplementary material b).

The results showed differences between enzyme activity and enzyme activity normalized by mtDNA content during aging. Consequently, mtDNA content could be an important factor for the normalization of mitochondrion-encoded enzymes, especially in the context of age.

Moreover, sex-dependent variation was revealed in the dependency of the normalized enzyme activity on the age group. The male group demonstrated changes in enzymatic activity with aging; meanwhile, the enzyme activities in females showed no specific trends with age.

The mtDNA content of skeletal muscle cells correlates more significantly with enzyme activities measured in the mitochondrial fraction than the homogenate

We studied the correlation of mtDNA content and enzyme activity of three enzymes measured in both the homogenate (COX and CS) and the mitochondrial fraction (COX, CS and SQR) in each skeletal muscle sample.

No correlation between CS activity and mtDNA content was detected in the homogenate ($r = 0.095$; $p = 0.182$); meanwhile the same correlation was statistically significant in the mitochondrial fraction ($r = 0.307$; $p = 0.001$) (Figure 3A, B). The correlation between COX activity and mtDNA content was statistically significant in both the homogenate ($r = 0.364$; $p = 0.001$) and mitochondrial fraction ($r = 0.452$; $p = 0.001$) (Figure 3C, D). According to these results, COX activity correlates with mtDNA content more significantly in the mitochondrial

fraction than in the homogenate. SQR activity correlated positively with mtDNA content ($r = 0.190$, $p = 0.008$) (Figure 3E).

The correlation between COX activity in the homogenate and mitochondrial fraction was statistically significant ($r = 0.723$; $p = 0.001$) (data not shown). The same result was observed in the correlation between CS activity in the homogenate and mitochondrial fraction ($r = 0.406$; $p = 0.00$) (data not shown).

The set of samples was divided according to the patient's gender to determine any sex-dependent trends. The correlations of COX activity with mtDNA content in the homogenate were significantly positive in both sex groups ($r = 0.383$, $p = 0.001$ in males; $r = 0.345$, $p = 0.001$ in females). Positive correlations between COX activity and mtDNA content were found in the mitochondrial fraction in both sexes ($r = 0.444$, $p = 0.001$ in males; $r = 0.431$, $p = 0.001$ in females) (Figure 3C, D). A similar situation was observed between CS activity and mtDNA content in the mitochondrial fraction. In both groups, significant correlations were found, although the female group had a higher correlation coefficient ($r = 0.269$, $p = 0.005$ in males; $r = 0.348$, $p = 0.001$ in females) (Figure 3B). No significantly positive correlations between SQR activity and mtDNA content were detected in either sex group ($r = 0.166$; $p = 0.094$ in males; $r = 0.199$; $p = 0.064$ in females). No sex-dependent significant differences were observed in all analyses.

Discussion

Although mtDNA content and enzyme activities together offer the potential to extend the general view of the mitochondrial functional state during aging, it is necessary to analyze the options

how they can be coupled meaningfully. Therefore the main objectives of this study were to determine mtDNA content and enzyme activities in context of age and gender and to MtDNA content expressed as mtDNA/nDNA was described as a biomarker of mitochondrial dysfunction. The increased mitochondrial biogenesis is initiated by higher oxidative stress, and as an adaptive response, the mtDNA content starts to rise [5]. An increasing mtDNA level was also detected during the shift from the prenatal to postnatal phase of human development when the conversion of anaerobic to aerobic metabolism is proceeding [2].

In our study, the unexpected results were revealed when the specific activities of the CS, COX and SQR enzymes and the mtDNA - normalized activities were compared. The normalized activities showed a downward trend through aging. This result could indicate that skeletal muscle loses its efficiency to produce COX activity per mtDNA unit with age. This hypothesis is in accordance with the fact that reduced muscle mitochondrial function, especially the capacity of ATP production, was demonstrated during aging [14, 27]. A more interesting result was found when the samples were divided into gender-specific groups. Surprisingly, only the male group showed this downward trend with age. The most obvious male downward trend was observed primarily in the normalized CS and COX activities; meanwhile, SQR activity did not vary dramatically. The mtDNA content in the male group increased with age; therefore, this result explains why the mtDNA-normalized activities decline. Nevertheless, the question of why this trend was only observed in the male group remains unanswered. Notably, the muscle composition and the ratio of strength to cross-sectional area are similar in both sexes [28, 29]. We suggest that our results reflect the effect of sex hormones respectively gender-specificity in mitochondriogenesis.

Because estrogen levels are more elevated in women than men, estrogen may play an important role in sex differences during the aging process [30]. Estrogens have positive direct and indirect effects on mitochondrial function and biogenesis [31]. When estrogen function is impaired, it affects mitochondrial gene expression and lipid utilization in skeletal muscle [32, 33]. Estrogen-activated estrogen receptor can increase mitochondrial superoxide dismutase activity and reduce mitochondrial oxidative damage, supporting the role of estrogen as a potential repressor of cellular senescence [34]. It was also confirmed by study of Gaignard et al. [35] where was shown that young female mice have higher concentrations of mitochondrial gluthathione compared with young males. This suggests that, during the reproductive period females may have better protection against damage induced by ROS. The estrogen level decreases in the end of the reproductive years. In humans, this time occurs around fifty years of age.

Similar to the estrogen effect on mitochondriogenesis, a low level of testosterone is involved in the decrease of OXPHOS gene expression [36]. In adult rats, testosterone induces protein synthesis and changes the shape and size of muscle fibers [37]. In humans, the testosterone level begins to decline at twenty years of age and continuously decreases for the rest of life [38]. In old rats, majority of genes involved in OXPHOS had higher expression in females compared to males [39]. Therefore, the increase in mtDNA content with age could be a compensatory effect when mitochondrial transcription declines and oxidative stress is increasing. We suppose that the sex differences in the mtDNA-normalized activities of CS, COX and SQR could reflect a distinct compensatory mechanism for age-related impairment of muscle mitochondria. It is also confirmed by the theory that mitochondrial genome function is optimized for the female, because of maternal inheritance of mitochondria – a situation called mother´s curse [40, 41]. Moreover

experiments in Drosophila support the existence of a load of mitochondrial mutations that preferentially promote aging in males [42].

Tissue homogenates and/or isolated mitochondrial fractions are commonly used for the enzymatic analysis of respiratory chain complexes. However, no actual data have been published about the differences in enzymatic activity determined using these two methods. Our results from a parallel analysis of COX and CS enzymatic activities and their correlations with mtDNA content showed a higher correlation coefficient in the mitochondrial fraction compared to the tissue homogenate. The only significantly positive correlation in the muscle homogenate was observed between COX activity and mtDNA content. We suggest several reasons for these observations. First, the protein noise in the homogenate and the biochemical context of isolated mitochondria could be relevant reasons for the different results between the sample preparations [43]. This result was demonstrated by the higher specific activities in the mitochondrial fraction than in the homogenate in our work and in the study by Chretien et al. [19]. Second, the subunits of the COX catalytic core are encoded by mtDNA, and its role is exclusively focused on the RC. In other words, its activity is directly entwined with mtDNA copy number in both backgrounds. On the contrary, CS plays an essential role in providing energy for cellular functions but also provides citrate-derived acetyl-CoA for lipogenesis and cholesterologenesis. The CS gene was identified as a direct target of RORα. This transcription factor has an essential role in the regulation of the circadian rhythm and lipid metabolism. Mice lacking functional RORα display reduced hepatic CS gene expression and CS enzyme activity [12]. The independent pathway of COX and CS regulation was demonstrated by kinase inhibitor studies. Using an inhibitor of p38-MAPK curtailed an increase in COX activity, but the CS catalytic activity was unaffected [44]. The regulatory pathway that involves the mitochondrial transcription factor NRF1 that induces

the upregulation of COX gene expression and results in increased COX enzyme activity does not appear to affect CS activity [45]. CS activity is a traditional marker of mitochondrial mass, and it is universally utilized for the normalization of RC complex activities. However, CS is an inconvenient normalization parameter when comparing different organs [3]. The possible variability in CS activity in different situations should be considered when it is related to mitochondrial mass or mtDNA content.

In summary, the current study demonstrates the sex differences with aging in the mtDNA-normalized mitochondrial enzyme activities. We suppose the gender-specific compensatory mechanism of age-dependent mitochondrial failure, which mechanistic details remain unrevealed as a particular challenge for next research.

We also show that mtDNA content is a useful normalization factor for human skeletal muscle as suggested in a study by Fernandez-Vizarra et al. [3] in animal tissues. Finally, our study revealed that the analysis of mitochondrial enzymes in two different sample preparations - muscle homogenate and muscle mitochondrial fraction - could offer two contrasting views of the relationship among mtDNA content and the specific activities of CS and COX.

Acknowledgements: This study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (GACR 14-36804G), by the Ministry of Health of the Czech Republic (AZV 17-30965A) and by Charles University (UNCE 204011, Progres Q26/LF1).

References

[1] Morten KJ, Ashley N, Wijburg F, Hadzic N, Parr J, Jayawant S, et al. (2007). Liver mtDNA content increases during development: a comparison of methods and the importance of age- and tissue-specific controls for the diagnosis of mtDNA depletion. Mitochondrion, 7: 386-395

[2] Pejznochova M, Tesarova M, Hansikova H, Magner M, Honzik T, Vinsova K, et al. (2010). Mitochondrial DNA content and expression of genes involved in mtDNA transcription, regulation and maintenance during human fetal development. Mitochondrion, 10: 321-329

[3] Fernandez-Vizarra E, Enriquez JA, Perez-Martos A, Montoya J, Fernandez-Silva P (2011). Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis. Mitochondrion, 11: 207-213

[4] Malik AN, Shahni R, Rodriguez-de-Ledesma A, Laftah A, Cunningham P (2011). Mitochondrial DNA as a non-invasive biomarker: accurate quantification using real time quantitative PCR without co-amplification of pseudogenes and dilution bias. Biochem Biophys Res Commun, 412: 1-7

[5] Malik AN, Czajka A (2013). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? Mitochondrion, 13: 481-492

[6] Moraes CT (2001). What regulates mitochondrial DNA copy number in animal cells? Trends Genet, 17: 199-205

[7] Vina J, Sastre J, Pallardo F, Borras C (2003). Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. Antioxid Redox Signal, 5: 549-556

[8] Mattingly KA, Ivanova MM, Riggs KA, Wickramasinghe NS, Barch MJ, Klinge CM (2008). Estradiol stimulates transcription of nuclear respiratory factor-1 and increases mitochondrial biogenesis. Mol Endocrinol, 22: 609-622

[9] Boffoli D, Scacco SC, Vergari R, Persio MT, Solarino G, Laforgia R, et al. (1996). Ageing is associated in females with a decline in the content and activity on the b-c1 complex in skeletal muscle mitochondria. Biochim Biophys Acta, 1315: 66-72

[10] Oyedotun KS, Lemire BD (2004). The quaternary structure of the Saccharomyces cerevisiae succinate dehydrogenase. Homology modeling, cofactor docking, and molecular dynamics simulation studies. J Biol Chem, 279: 9424-9431

[11] Solt LA, Kojetin DJ, Burris TP (2011). The REV-ERBs and RORs: molecular links between circadian rhythms and lipid homeostasis. Future Med Chem, 3: 623-638

[12] Crumbley C, Wang Y, Banerjee S, Burris TP (2012). Regulation of expression of citrate synthase by the retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha (RORalpha). PLoS One, 7: e33804

[13] Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, Nair KS (1996). Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A, 93: 15364-15369

[14] Short KR, Bigelow ML, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, et al. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 5618-5623

[15] Thompson JR, Swanson SA, Casale GP, Johanning JM, Papoutsi E, Koutakis P, et al. (2013). Gastrocnemius mitochondrial respiration: are there any differences between men and women? J Surg Res, 185: 206-211

[16] Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, et al. (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 A. Science, 269: 1069-1074

[17] Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landazuri MO, et al. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. Cell Metab, 16: 378-386

[18] Scarpulla RC (2002). Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. Gene, 286: 81-89

[19] Chretien D, Rustin P, Bourgeron T, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A (1994). Reference charts for respiratory chain activities in human tissues. Clin Chim Acta, 228: 53-70

[20] Barrientos A, Casademont J, Rotig A, Miro O, Urbano-Marquez A, Rustin P, et al. (1996). Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun, 229: 536-539

[21] Gaignard P, Lebigot E, Therond P, Slama A (2015). Age-realated decline in muscle mitochondrial function is different between men and women. J Inherit Metab Dis, 38: S221

[22] Rickwood D, Wilson MT, Darley-Usmar VM (1987) Isolation and characteristics of intact mitochondria. In *Mitochondria: A Practical Approach* (Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D., eds), IRL Press, Oxford, UK

[23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265-275

[24] Srere PA, John ML (1969) Citrate synthase: EC 4.1.3.7. [Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. . In *Methods in Enzymology*, Academic Press

[25] Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. Clin Chim Acta, 228: 35-51

[26] Kajander OA, Poulton J, Spelbrink JN, Rovio A, Karhunen PJ, Jacobs HT (1999). The dangers of extended PCR in the clinic. Nat Med, 5: 965-966

[27] Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A, Hood DA (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. Aging Cell, 7: 2-12

[28] Costill DL, Daniels J, Evans W, Fink W, Krahenbuhl G, Saltin B (1976). Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. J Appl Physiol, 40: 149-154

[29] Staron RS, Hagerman FC, Hikida RS, Murray TF, Hostler DP, Crill MT, et al. (2000). Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. J Histochem Cytochem, 48: 623-629

[30] Velarde MC (2013). Pleiotropic actions of estrogen: a mitochondrial matter. Physiol Genomics, 45: 106-109

[31] Klinge CM (2008). Estrogenic control of mitochondrial function and biogenesis. J Cell Biochem, 105: 1342-1351

[32] Spangenburg EE, Geiger PC, Leinwand LA, Lowe DA (2012). Regulation of physiological and metabolic function of muscle by female sex steroids. Med Sci Sports Exerc, 44: 1653-1662

[33] Cavalcanti-de-Albuquerque JP, Salvador IC, Martins EL, Jardim-Messeder D, Werneck-de-Castro JP, Galina A, et al. (2014). Role of estrogen on skeletal muscle mitochondrial

function in ovariectomized rats: a time course study in different fiber types. J Appl Physiol (1985), 116: 779-789

[34] Pedram A, Razandi M, Wallace DC, Levin ER (2006). Functional estrogen receptors in the mitochondria of breast cancer cells. Mol Biol Cell, 17: 2125-2137

[35] Gaignard P, Savouroux S, Liere P, Pianos A, Therond P, Schumacher M, et al. (2015). Effect of Sex Differences on Brain Mitochondrial Function and Its Suppression by Ovariectomy and in Aged Mice. Endocrinology, 156: 2893-2904

[36] Pitteloud N, Mootha VK, Dwyer AA, Hardin M, Lee H, Eriksson KF, et al. (2005). Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. Diabetes Care, 28: 1636-1642

[37] Ustunel I, Akkoyunlu G, Demir R (2003). The effect of testosterone on gastrocnemius muscle fibres in growing and adult male and female rats: a histochemical, morphometric and ultrastructural study. Anat Histol Embryol, 32: 70-79

[38] Brown M (2008). Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. Adv Physiol Educ, 32: 120-126

[39] Vijay V, Han T, Moland CL, Kwekel JC, Fuscoe JC, Desai VG (2015). Sexual dimorphism in the expression of mitochondria-related genes in rat heart at different ages. PLoS One, 10: e0117047

[40] Tower J (2015). Mitochondrial maintenance failure in aging and role of sexual dimorphism. Arch Biochem Biophys, 576: 17-31

[41] Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf FW (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. Trends Ecol Evol, 19: 238-244

[42] Camus MF, Clancy DJ, Dowling DK (2012). Mitochondria, maternal inheritance, and male aging. Curr Biol, 22: 1717-1721

[43] Villani G, Greco M, Papa S, Attardi G (1998). Low reserve of cytochrome c oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types. J Biol Chem, 273: 31829-31836

[44] Kraft CS, LeMoine CM, Lyons CN, Michaud D, Mueller CR, Moyes CD (2006). Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. Am J Physiol Cell Physiol, 290: C1119-1127

[45] Herzig RP, Scacco S, Scarpulla RC (2000). Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. J Biol Chem, 275: 13134-13141

Tables

[Insert Tables text here]

Figure legends

Figure 1: The mtDNA content per cell and the specific age-groups (Kruskal-Wallis test and Wilcoxon test). The male mtDNA level is statistically dependent on age-group ($p = 0.001$) and on the basis of post hoc test the youngest group is significantly different from all others (0-10y vs. 11-20y: $p = 0.001$, 0-10y vs. 21-40y: $p = 0.005$, 0-10y vs. 41-78y: $p = 0.005$). The medians showed continual increasing of mtDNA level with age (1682 (0-10y), 3060 (11-20y), 3570 (21-40y), 3182 (41-78y)) (gray boxes). The female mtDNA content per cell does not show any dependency on age-group ($p = 0.085$) and the medians does not predicate any trend with age (1499 (0-10y), 2650 (11-20y), 2050 (21-40y), 2409 (41-78y)) (white boxes). Wilcoxon test showed no significant differences between the sexes ($p = 0.672$ (0-10y), $p = 0.526$ (11-20y), $p = 0.508$ (21-40), $p = 0.152$ (41-78y)).

Figure 2: The normalized activities measured in mitochondrial fraction and the specific age-groups (Kruskal-Wallis test). Normalized enzymatic activities of CS, COX and SQR divided according to the sex are presented. Male normalized activities are age-group dependent: CS ($p = 0.010$) (A), COX ($p = 0.005$) (C) and SQR ($p = 0.013$) (E) meanwhile female normalized activities were not found as age-group dependent: CS ($p = 0.078$) (B), COX (0.349) (D) and SQR ($p = 0.302$) (F). the normalized activity = the specific enzyme activity / mtDNA content per cell

Figure 3: The correlations between the enzyme activities of citrate synthase (CS), cytochrome c oxidase (COX) or succinate-coenzyme Q reductase (SQR) and mtDNA content per cell in

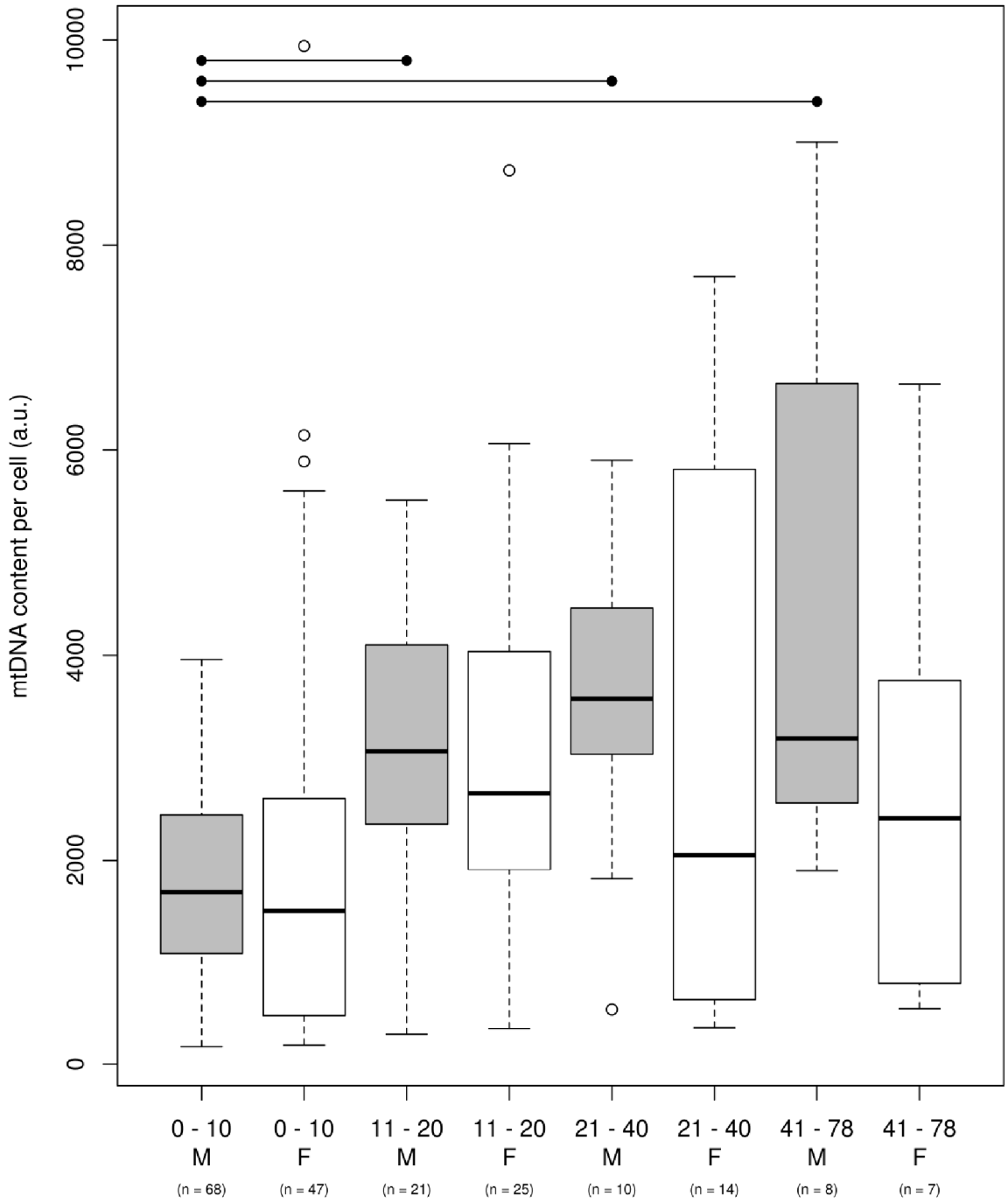
skeletal muscle (Spearman´s correlation test). The correlation of CS enzyme activity measured in homogenate and mtDNA level showed the insignificant results for males ($r = 0.001$, $p = 0.990$, $n = 105$) and females ($r = 0.172$, $p = 0.098$, $n = 98$) (A) on the other hand the correlation results in mitochondrial fraction were significantly positive for both males ($r = 0.269$, $p = 0.005$, $n = 107$) and females ($r = 0.348$, $p = 0.001$, $n = 92$) (B). The correlation between COX activity and mtDNA level demonstrated significantly positive results in both backgrounds homogenate (males: $r = 383$, $p = 0.001$, $n = 107$; females: $r = 345$, $p = 0.001$, $n = 93$) (C) and mitochondrial fraction (males: $r = 0.444$, $p = 0.001$, $n = 107$; females: $r = 0.431$, $p = 0.001$, $n = 93$) (D). Moreover, the SQR activity measured in mitochondrial fraction was correlated with mtDNA content (males: $r = 0.166$, $p = 0.094$, $n = 103$; females: $r = 0.199$, $p = 0.064$, $n = 88$).
mito – mitochondrial fraction, dashed line and black points – females, dotted line and blank points – males, solid line – whole set

Supplementary figure 1: CS (A), COX (B) and SQR (C) enzyme activities normalized by mtDNA content per cell as age-group dependent ($p = 0.002$, $p = 0.014$, $p = 0.023$).

Supplementary figure 2: An age-group dependency or a specific trend with age in male or female enzyme activities: CS males ($p = 0.081$) (A), CS female ($p = 0.637$) (B), COX males ($p = 0.068$) (C), COX females ($p = 0.394$) (D), SQR males ($p = 0.137$) (E) and SQR females ($p = 0.197$) (F).

1 Figure 1

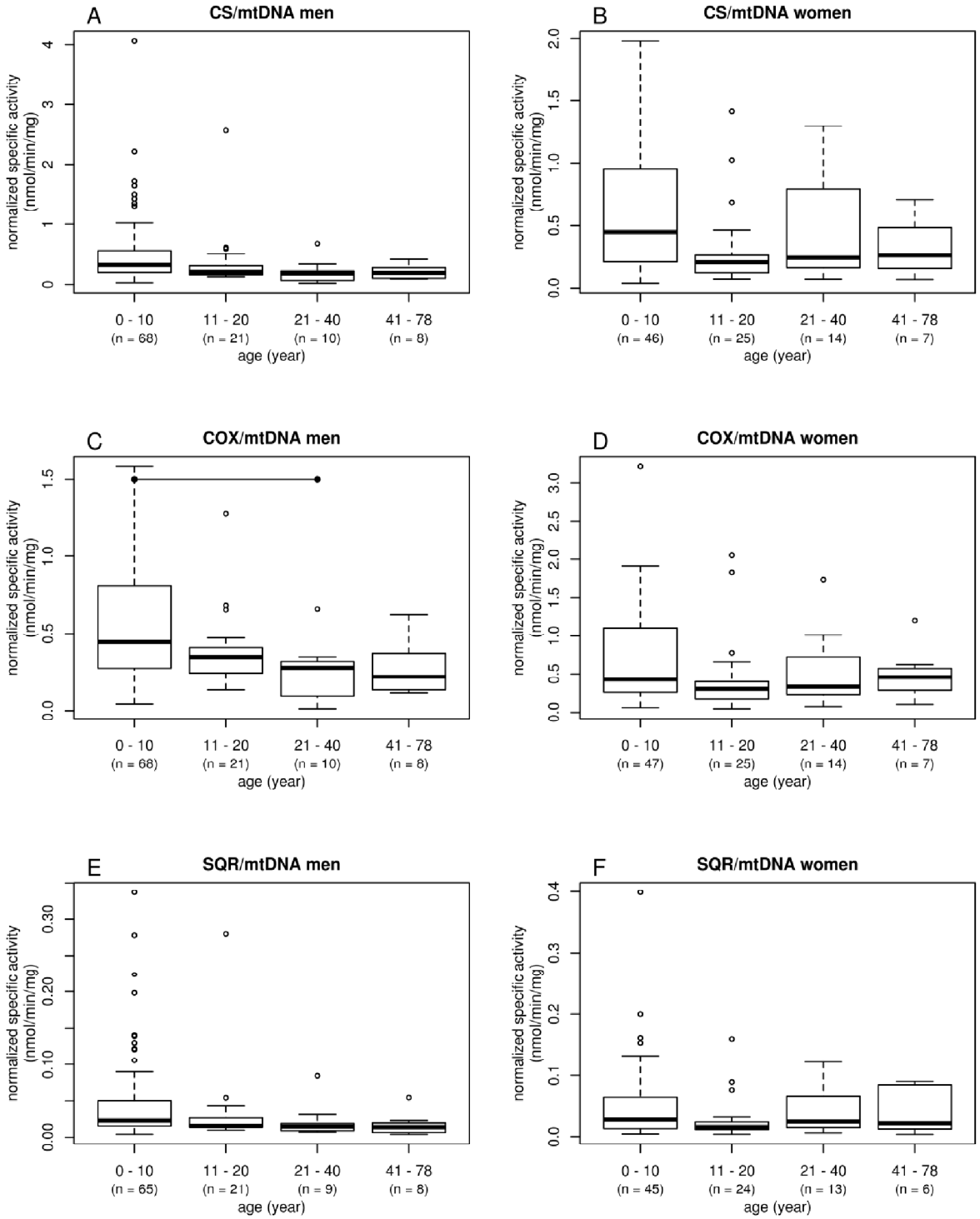
2



3

4

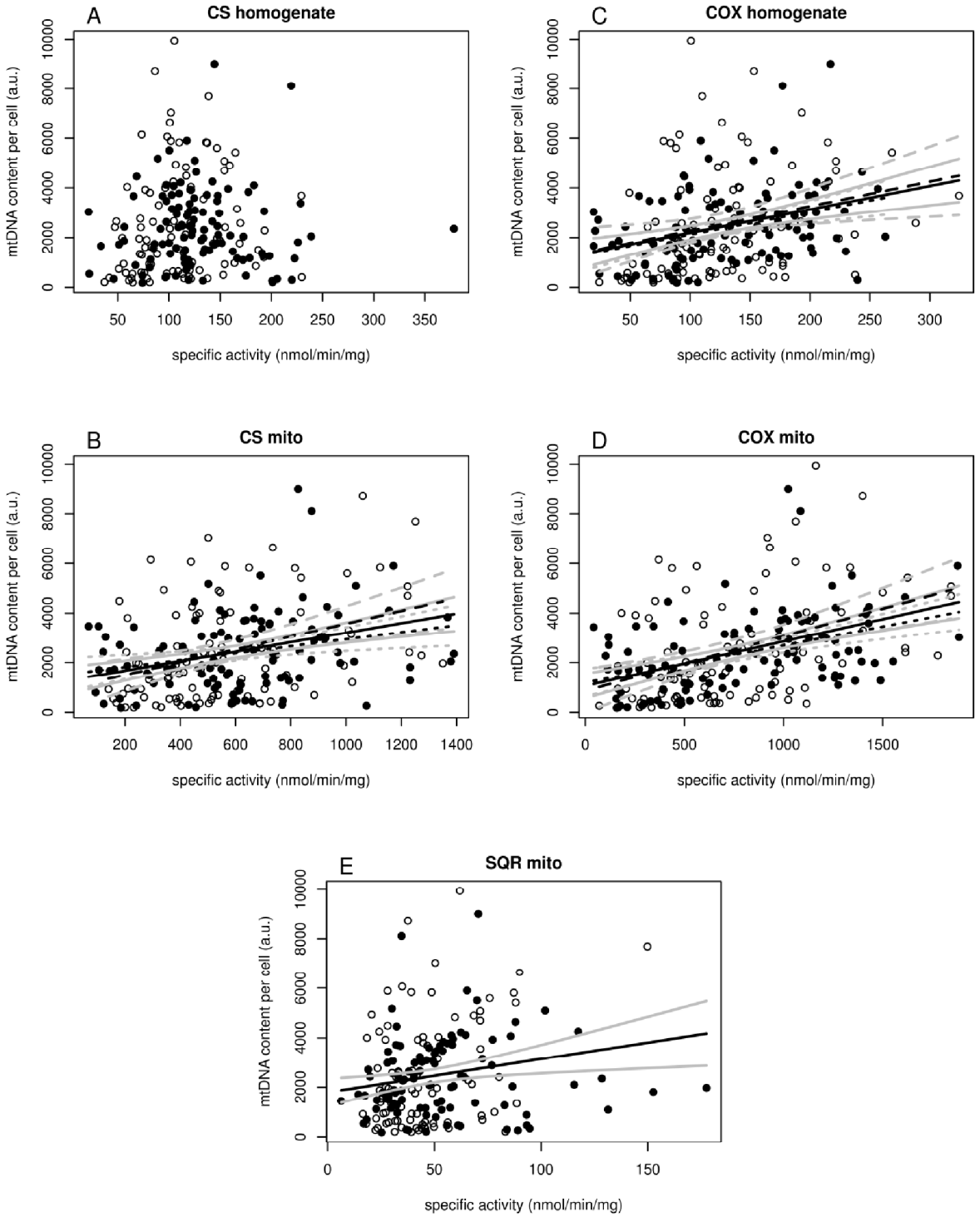
1 Figure 2


A
CS/mtDNA men
normalized specific activity (nmol/min/mg)
0 - 10 (n = 68)
11 - 20 (n = 21)
21 - 40 (n = 10)
41 - 78 (n = 8)
age (year)
B
CS/mtDNA women
normalized specific activity (nmol/min/mg)
0 - 10 (n = 46)
11 - 20 (n = 25)
21 - 40 (n = 14)
41 - 78 (n = 7)
age (year)
C
COX/mtDNA men
normalized specific activity (nmol/min/mg)
0 - 10 (n = 68)
11 - 20 (n = 21)
21 - 40 (n = 10)
41 - 78 (n = 8)
age (year)
D
COX/mtDNA women
normalized specific activity (nmol/min/mg)
0 - 10 (n = 47)
11 - 20 (n = 25)
21 - 40 (n = 14)
41 - 78 (n = 7)
age (year)
E
SQR/mtDNA men
normalized specific activity (nmol/min/mg)
0 - 10 (n = 65)
11 - 20 (n = 21)
21 - 40 (n = 9)
41 - 78 (n = 8)
age (year)
F
SQR/mtDNA women
normalized specific activity (nmol/min/mg)
0 - 10 (n = 45)
11 - 20 (n = 24)
21 - 40 (n = 13)
41 - 78 (n = 6)
age (year)

2

3

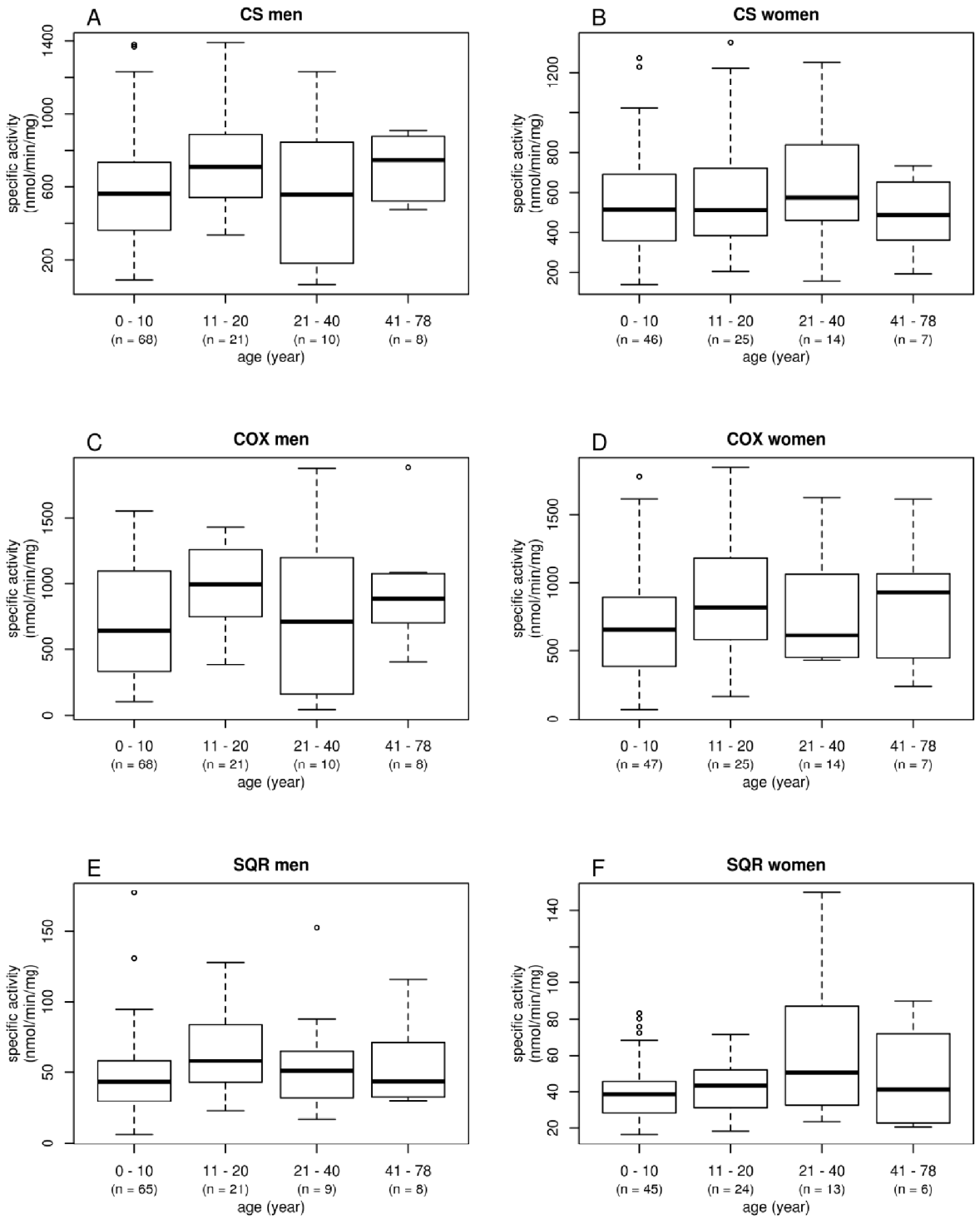
1 Figure 3:


A
CS homogenate
C
COX homogenate
B
CS mito
D
COX mito
E
SQR mito
mtDNA content per cell (a.u.)
specific activity (nmol/min/mg)

2

3

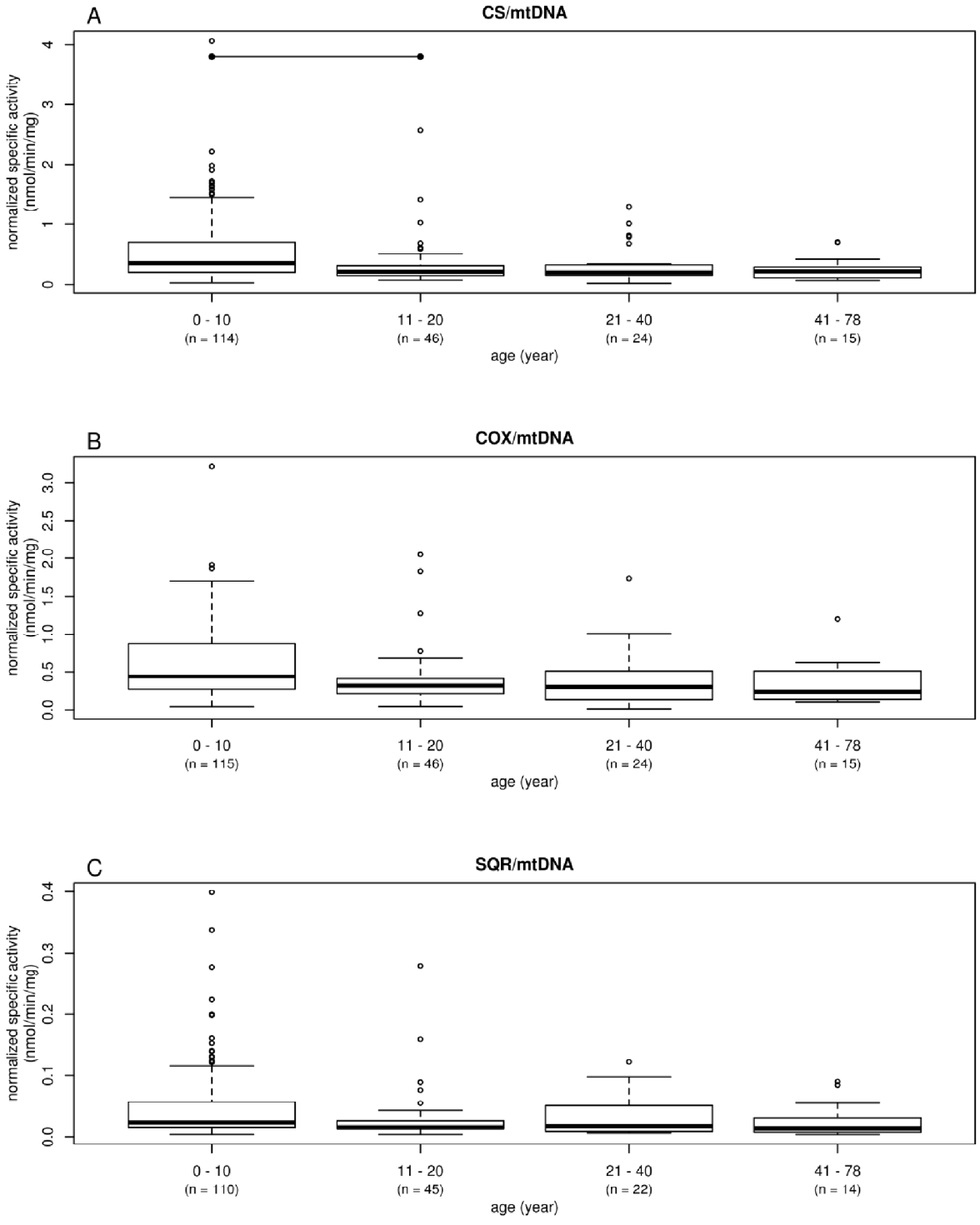
1 Supplementary figure 1:



2

3

1 Supplementary figure 2:



2

3

Supplement 5]

***Kolarova, H.**, Tesarova, M., Liskova, P., Kousal, B., Forgac, M., Havrankova, P., Zeman, J. and Honzik, T.*

***Extraocular features may be the essential presentation in m.11778G>A LHON carriers**.*

Multicenter study - publication in preparation

Extraocular symptoms may be the only presentation in LHON patients with m.11778G>A

Kolarova H[1], Tesarova M[1], Liskova P[2], Kousal B[2], Forgac M[3], Havrankova P[3], Zeman J[1] and Honzik T[1]

[1]Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic
[2]Department of Ophthalmology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic
[3]Department of Neurology and Centre of Clinical Neuroscience, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Czech Republic

INTRODUCTION

- Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON) is one of the most common inherited optic neuropathies that preferentially causes blindness in young adult males.
- Generally, eye is the only affected organ in LHON but a small subgroup of patients will develop additional extraocular features. These are described only in patients with symptoms of optic neuropathy.
- Synergic role of co-existing mitochondrial DNA (mtDNA) variants may relate to neurological complications in LHON.[1]
- Herein, we present a family carrying the primary m.11778G>A, where several female members presented with dominant extraocular features over only slightly affected or unaffected visual functions.

RESULTS I

In our Centre for patients with Mitochondrial optic neuropathies, we have examined 54 patients with LHON carrying either m.11778G>A (n=45), m.3460G>A (n=6) and m.14484T>C (n=3). All but 2 symptomatic patients manifesting with progressive, painless binocular vision loss, were men. The average age at onset was 24 years. Altogether, 16 patients were clinically asymptomatic, but detailed neuro-ophthalmic examination revealed discrete alterations (i.e. subclinical carriers). The remaining 18 patients were completely asymptomatic. Interestingly, extraocular symptoms were expressed in 11 carriers (Tab. 1). All but two (symptomatic woman and man, both carrying m.3460G>A with tremor, peripheral neuropathy and myopathy, and isolated tremor, respectively) had m.11778G>A. Although extraocular symptoms were present only in symptomatic males who suffered visual failure, in women, these developed more often in subclinical individuals. Myopathy was the most common extraocular symptom and it manifested only in women. Contrarily, isolated tremor was present in 4 males including one with other neocerebellar symptoms (dysarthria, ataxia and hypermetropy).

Tab. 1 Extraocular symptoms in 11

	Male		Female	
	Symptomatic (n=)	Subclinical (n=)	Symptomatic (n=)	Subclinical (n=)
PNP	-	-	1	2
Myopathy	-	-	1	5
Hearing loss	-	-	-	3
Tremor	4	-	1	-
Neocerebellar s.	1	-	-	-

PNP: peripheral neuropathy, s.: syndrome

RESULTS II

The most remarkable feature is the dominance of extraocular symptoms (myopathy, hearing loss and peripheral neuropathy) over only slightly affected visual functions in a family with m.11778G>A mutation (IV/11, V/12 and V/13) (Fig. 1). Notably, in one patient with hearing loss and myopathy, visual impairment is completely absent (V/11). In all four patients, available muscle specimen showed focal subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase product and cytochrome *c* oxidase negative fibres in up to 5 % and 15 % of muscle fibres, respectively (Fig. 2), and decreased activity of complexes I-III to 22-39% of controls. Moreover, in two of these patients (IV/11 and V/12), we also documented moderate sensorineural hearing loss.

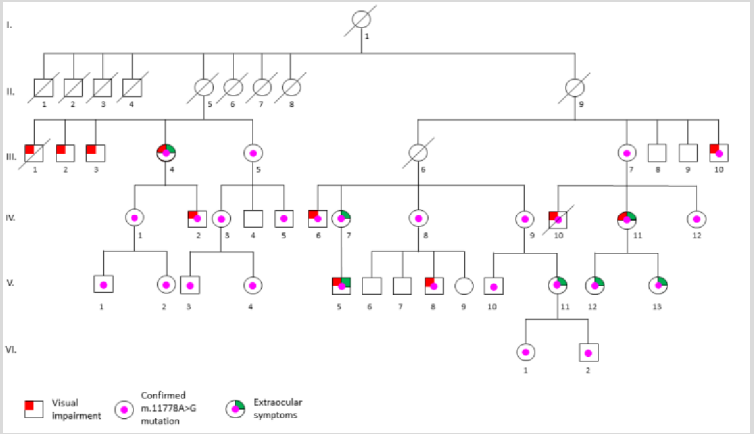
MtDNA sequencing

MtDNA sequencing performed in all family members revealed a prevalent m.11778G>A mutation, one synonymous variant m.3663A>G in *MT-ND1* (0.07 %) and two non-synonymous polymorphisms m.9632A>G in *MT-CO3* and m.12083T>G in *MT-ND4* (both 0.18 %).

Whole Exome Sequencing

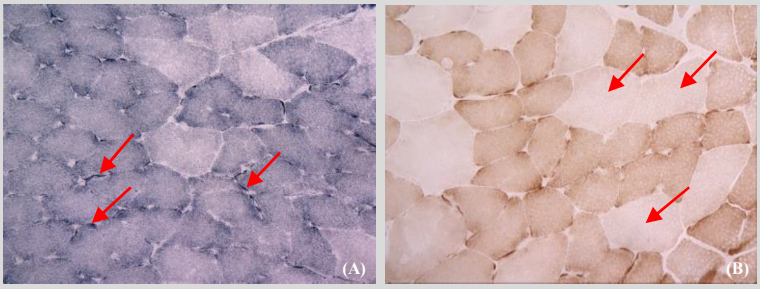
Whole Exome Sequencing (WES) was performed in III/7, IV/11, V/11, V/12 and V/13. None of the variant found could explain the development of extraocular symptoms.

Fig. 1



Family tree of a large family with LHON syndrome based on m. 11778G>A. Interestingly, there is a high incidence of prevailing extraocular symptoms with only mildly affected visual functions (IV/11, V/12 and V/13). In one patient with histologically confirmed myopathy (V/11), visual function were not altered at all.

Fig. 2



Histology of muscle biopsy of a 37-year-old woman with m.11778G>A (V/11) presenting only with the extraocular phenotype. Although the presence of typical ragged red fibres was not observed in skeletal muscle histochemistry, the severity of the subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase product (marked by arrows) in a proportion of muscle fibres was moderate (succinate dehydrogenase histochemistry, original magnification 400×) (A). In cytochrome *c* oxidase histochemistry, there were abundant cytochrome *c* oxidase negative fibres in up to 15 % of fibres (cytochrome *c* oxidase histochemistry, original magnification 200×, indicated by arrows) (B).

CONCLUSION

- Due to the high incidence of extraocular symptoms, especially in the Czech LHON female patients, we emphasize the need for their search and management even in subclinical or asymptomatic cases.
- Negative mtDNA sequencing and WES in our family support the exclusive role of m.11778G>A in the development of extraocular symptoms.

METHODS

- Activities of respiratory enzymes were measured spectrophotometrically; detailed description of these procedures routinely performed in our laboratory can be found elsewhere.[2]
- MtDNA sequencing and WES was performed as described in detail elsewhere.[3,4]

DECLARATION OF INTEREST: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this report.
SUPPORTED BY: GAUK 38515, AZV 16-32341A and SVV 260367.
REFERENCES: [1]Riordan-Eva *et al., Neurology*, 2008; [2]Rustin *et al., Clin Chim Acta*, 1994; [3]Fornuskova *et al., BBA*, 2008; [4]Mazurova *et al., Cardiol young*, 2016.

Supplement 6]

Kousal, B., ***Kolarova, H.****, Meliska, M., Bydzovsky, J., Kulhanek, J., Honzik, T., Liskova, P.*

Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy.

JAMA Ophthalmol (submitted)

Acta Ophthalmologica

Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy

Journal:	*Acta Ophthalmologica*
Manuscript ID	ACTA-17-10-1187
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	03-Oct-2017
Complete List of Authors:	Kousal, Bohdan; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Ophthalmology; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine Kolarova, Hana; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine Meliska, Martin; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Ophthalmology Bydzovsky, Jan; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Ophthalmology Kulhanek, Jan; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine Votruba, Marcela; Cardiff University, School of Optometry & Visual Sciences; University Hospital of Wales, Cardiff Eye Unit Honzik, Tomas; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine Liskova, Petra; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Ophthalmology; First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine
Keywords:	Leber hereditary optic neuropathy, mitochondrial, optical coherence tomography angiography, peripapillary microcirculation, microangiopathy

SCHOLARONE™
Manuscripts

Peripapillary microcirculation in Leber hereditary optic neuropathy

Running title: Peripapillary microcirculation in LHON

Bohdan Kousal,[1,2] Hana Kolarova,[2] Martin Meliska,[1] Jan Bydzovsky,[1] Jan Kulhanek,[2] Marcela Votruba,[3,4] Tomas Honzik[2] and Petra Liskova[1,2]

[1]Department of Ophthalmology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

[2]Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

[3]School of Optometry & Vision Sciences, Cardiff University, Cardiff, UK

[4]Cardiff Eye Unit, University Hospital of Wales, Cardiff, UK

Correspondence:

Petra Liskova, MD, PhD

Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague

Ke Karlovu 2, Praha 2, 128 08, Prague, Czech Republic

Tel: +420 22496 7139

E-mail address: petra.liskova@lf1.cuni.cz

For Peer Review

ABSTRACT

Purpose: In this prospective observational comparative case series, we aimed to study the peripapillary capillary network with spectral-domain optical coherence tomography angiography (OCT-A; Spectralis OCT2, Heidelberg Engineering) in Leber hereditary optic neuropathy (LHON).

Methods: Twelve eyes of six individuals, of these three males (5 eyes) after clinical onset of visual impairment, all carriers of one of the three mtDNA prevalent mutations causing LHON, were imaged by OCT-A with scans centred on optic discs. Control group consisted of 6 eyes with no visual impairment.

Results: The three affected individuals lost vision 6 years (at age 22 years), 2 years and 3 months (at age 26 years) and 1 year and 2 months (at age 30 years) prior to OCT-A examination. The three clinically unaffected mutation carriers examined were two males (age 11 and 18 years) and one female (age 41 years). All 5 affected eyes had alterations in density of the radial peripapillary microvascular network, including an eye of a patient treated with idebenone that underwent almost full recovery (best corrected visual acuity 0.87). Interestingly, the other eye showed normal ocular findings 14 months after onset. Results of OCT-A examination in this eye were unfortunately inconclusive due to a delineation error. There were no differences between unaffected mutation carriers and control eyes.

Conclusions: OCT-A scans confirmed that the peripapillary microvascular network is highly abnormal in eyes manifesting vision loss due to LHON. These findings support the hypothesis that microangiopathy contributes to the development of vision loss in this mitochondrial disorder.

Key words: Leber hereditary optic neuropathy – mitochondrial - optical coherence tomography angiography - peripapillary microcirculation - microangiopathy

For Peer Review

INTRODUCTION

Leber hereditary optic neuropathy (LHON, OMIM #535000) is a rare disorder caused by mutations in mitochondrial DNA. It is the most common inherited optic neuropathy with a reported prevalence of 31,000-50,000 (Spruijt et al. 2006; Puomila et al. 2007; Y-W-Man et al. 2014; Gorman et al. 2015). The disease affects predominantly males (80%–90% of cases) (Newman 2005). The onset of symptoms occurs mainly in the second and third decade of life. Typically, there is a subacute loss of vision accompanied by optic disc hyperemia, pseudoedema, peripapillary blood vessel abnormalities such as telangiectasia and tortuosity, and swelling of the retinal nerve fibre layer (RNFL) (Meyerson et al. 2015). As the disease progress to chronic atrophic phase, optic disc pallor develops reflecting the death of retinal ganglion cells (RGCs) (Mashima et al. 2003; Newman 2005).

Optical coherence tomography angiography (OCT-A) provides high-resolution images of retinal and peripapillary capillaries by non-invasive visualization of vascular flow via motion contrast (de Carlo et al. 2015). This novel technique has several advantages over fluorescein angiography which has been the gold standard to evaluate retinal circulation in LHON patients (Smith et al. 1973; Nikoskelainen et al. 1977; Chalmers & Schapira 1999). Apart from greater resolution, OCT-A visualizes vascular structures in an arbitrarily selected depth of retinal layers without the need to administer a contrast agent (Spaide et al. 2015). To date, OCT-A imaging has been shown only in three separate cases with visual loss due to LHON (Y-W-Man et al. 2014; De Rojas et al. 2016; Gaier et al. 2016).

The purpose of this study was to evaluate the radial peripapillary capillary network in a series of individuals affected by vision loss due to LHON and asymptomatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutation carriers in comparison to control eyes, and thus to improve our understanding of the pathogenetic mechanisms involved in the disease development and to assess the utility of OCT-A in clinical management of individuals with pathogenic mtDNA mutations.

METHODS

Six individuals (12 eyes) from four families, all confirmed carriers of one the three prevalent pathogenic LHON mtDNA mutations (Table 1) and 6 healthy control eyes of three unrelated individuals were enrolled into the study.

For Peer Review

All subjects underwent ocular examination including measurement of best corrected visual acuity (BCVA) using Early Treatment Diabetic Retinopathy Study charts and extrapolated into decimal values. Visual field was assessed using standard automated perimeter (M-700 Medmont International, Vermont, Australia). Next, we performed spectral-domain OCT (SD-OCT) (Spectralis, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) of the macula and peripapillary retinal nerve fibre layer (RNFL) thickness measurements by circular scans 3.5-3.6 mm in diameter around the optic disc. The normal range of global RNFL thickness was regarded as 97.41±11.73 µm in children and 97.52±9.83 µm in adults as well as 90.44±20.49 µm in children and 83.65±14.98 µm for temporal quadrant (Chung et al. 2016). Colour vision was tested using Lanthony desaturated 15 hue test (more than one major crossing was considered as abnormal (Shoji et al. 2009) and contrast sensitivity with Pelli-Robson charts (values <1.50 were regarded as abnormal) (Leat et al. 1999).

OCT-A (Spectralis OCT2, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany) was performed between February and April 2017 by one skilled technician (MM). The scans with a 3x3 mm field of view were centred on the optic disc. Images from several depths were compared between eyes.

The study followed the Helsinki Declaration and all individuals or their legal representatives signed informed consent.

RESULTS

Basic demographic characteristics and clinical details of the study participants are provided in Table 1. Patient 2 is a brother of an unaffected carrier 5 and subject 4 is a son of individual 6. Five individuals (1, 2, 4-6; Table 1) harboured m.11778G>A in a homoplasmic state, individual 3 was homoplasmic for m.14484T>C (Table 1).

The clinical course of LHON in individuals 1 and 2 was typical with bilateral visual loss resulting into RNFL thinning more pronounced in the temporal quadrant, visible optic disc pallor, central and visual field defects (Fig. 1A-D), decreased contrast sensitivity and colour vision deficiency (Table 1).

Patient 3 experienced visual loss in the left eye at the age of 29 years and 3 months. 27 days after the onset BCVA in his left eye was 0.032 with profound visual field loss (Fig. 2D), colour vision defects and contrast sensitivity decrease. Pseudoedema of the left optic disc was documented by SD-OCT

For Peer Review

(Fig. 2F-H). In the right eye clinical findings were normal with BCVA 1.0 and no decrease in contrast sensitivity or colour vision deficiency. Few mild central visual field defects were detected which were attributed to a learning curve (Figure 2C). LHON diagnosis was confirmed by molecular genetic testing and idebenone treatment (900 mg/day) started 27 days after the onset. The left eye recovered significantly and at the point of OCT-A examination, 14 months after disease manifestation, BCVA improved to 0.87 and only few mild central visual field defects could be documented (Fig. 1F). Significant RNFL thinning confirmed atrophy of the left optic disc (Table 1, Fig. 1F). Examination of the right eye showed no pathology (Fig. 1E).

Subjects 4 was 11 years old at the time of OCT-A. He was tested for the presence of m.11778G>A after LHON manifestation in his younger brother. Neither he nor his parents noticed any decrease of BCVA at any point. Consistent with this his ocular examination was normal (Table 1, Fig. 1G, H). Individuals 5 and 6, also carriers of m.11778G>A, had also completely normal ocular findings including RNFL measurements (Table 1, Fig. 1I-L).

OCT-A demonstrated peripapillary capillary dropout at the level of RNFL, i.e. from the internal limiting membrane (ILM) to RNFL posterior boundary in all eyes with LHON manifestation (i.e. both eyes of individuals 1, 2 and the left eye of individual 3) (Fig. 1A-D, F). Because of problems with automatic peripapillary delineation of RNFL (without the possibility of manual correction) in the right eye of individual 3, we had to decentre the scan slightly temporally. Therefore, comparison with other scans was not reliable. Nevertheless, a small capillary dropout was suggested (Fig. 1E).

Overall, on OCT-A the vascular network, as measured by total retinal thickness (ILM to Bruch membrane) demonstrated differences between the affected eyes and normal controls with a reduction of capillary density corresponding to the disease severity (Supplementary Fig. 1). At the level of ganglion cell layer (GCL) differences could be also noted but only in the two severely affected individuals 1 and 2. No major abnormalities were noted in microvascularization between the inner and outer plexiform layer in any of the affected individuals (Supplementary Fig. 1).

For Peer Review

DISCUSSION

OCT-A is a novel, safe and rapid method that offers dissection of optic disc vascular perfusion and thus may help to differentiate various types of optic nerve disorders. To the best of our knowledge, this is the first study evaluating the radial peripapillary capillary network by OCT-A in a series of individuals carrying mtDNA mutations causing LHON, including three affected subjects and three unaffected carriers. Previously the microvascular network visualized by OCT-A has been reported in three separate cases, a 5-year-old patient, carrier of m.11778G>A (Takayama et al. 2017), a 17-year-old man, carrier of m.14484T>C (De Rojas et al. 2016) and a man in his 30s, carrier of m.11778G>A. (Gaier et al. 2016).

We have documented reduction in radial peripapillary microvascular network correlating with RNFL thinning and visual field loss in all 5 affected eyes of 3 individuals (2 carries of m.11778G>A and one carrier of m.14484T>C). Unfortunately, due to a delineation error it was not possible to appropriately compare the right eye of individual 3 that has not experienced subjective onset of vision loss and had normal ocular findings included RNFL thickness 14 months after the disease onset in the left eye.

The limitations of the current study are that quantitative assessment of capillary densities could not be performed due to lack of available software. Also, due to the impossibility of performing the OCTA-A repeatedly we cannot comment on artefacts and variability in between different examinations.

There are several theories how mitochondrial dysfunction may reduce blood flow, including a direct effect on endothelial cell and vascular smooth muscle viability (Chiong et al. 2014; Goveia et al. 2014). Our observations support the hypothesis that microangiopathy contributes to the visual loss in LHON.

Apart from OCT-A imaging we also document in detail the disease course in an individual with unilateral LHON 14 months after the disease onset, which is a rare finding, described in the literature in very few adult cases (Jacobson et al. 1998; Dandekar et al. 2002; Nagai et al. 2005; Sugisaka et al. 2007). Twenty-seven days after the disease manifestation, there was a significant increase of RNFL thickness in superior, inferior and nasal quadrants while in the temporal quadrant it was within the range. This is in line with most recent prospective observations (Hwang et al. 2017). Our study adds to this study by providing SD-OCT cross sectional imaging of the affected optic head nerve.

For Peer Review

In conclusion, OCT-A results confirm that optic neuropathy in LHON patients is associated with decreased microcirculation primarily in the RNFL and GCL layer. Studies with larger sample sizes are necessary to assess the clinical usefulness of OCT-A in individuals with pathogenic mutations in mtDNA in terms of disease onset prediction and recovery. Results of OCT-A imaging in LHON patients in this and a previous study raise the expectation that the method could be used in diagnosing and monitoring function and apoptosis of retinal ganglion cells and thus further aid unravelling the pathogenesis of mitochondrial disorders.

For Peer Review

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the AZV 16-32341A and SVV UK 260367/2017. Institutional support was provided by UNCE 204011 and PROGRES-Q26/LF1 programs of the Charles University.

REFERENCES

Chalmers RM & Schapira AH (1999): Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. Biochim Biophys Acta **1410**: 147-58.

Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, García-Miguel M & Mellado R (2014): Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. Front Cell Dev Biol **2**: 72.

Chung HK, Han YK, Oh S & Kim SH (2016): Comparison of optical coherence tomography measurement reproducibility between children and adults. PLoS ONE **11**: e0147448.

Dandekar SS, Graham EM & Plant GT (2002): Ladies with Leber's hereditary optic neuropathy: an atypical disease. Eur J Ophthalmol **12**: 537-41.

de Carlo TE, Romano A, Waheed NK & Duker JS (2015): A review of optical coherence tomography angiography (OCTA). Int J Retina Vitreous **1**: 5.

De Rojas JO, Rasool N, Chen RW, Horowitz J & Odel JG (2016): Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. Neurology **87**: 2065-2066.

Gaier ED, Gittinger JW, Cestari DM & Miller JB (2016): Peripapillary capillary dilation in Leber hereditary optic neuropathy revealed by optical coherence tomographic angiography. JAMA Ophthalmol **134**: 1332-1334.

Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y et al. (2015): Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. Ann Neurol **77**: 753-759.

Goveia J, Stapor P & Carmeliet P (2014): Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease. EMBO Mol Med **6**: 1105-20.

Hwang TJ, Karanjia R, Moraes-Filho MN et al. (2017): Natural history of conversion of Leber's hereditary optic neuropathy: A prospective case series. Ophthalmology **124**: 843-850.

Jacobson DM, Stone EM, Miller NR, Pollock SC, Fletcher WA, McNussen PJ & Martin TJ (1998): Relative afferent pupillary defects in patients with Leber hereditary optic neuropathy and unilateral visual loss. Am J Ophthalmol **126**: 291-5.

Leat SJ, Legge GE & Bullimore MA (1999): What is low vision? A re-evaluation of definitions. Optom Vis Sci **76**: 198-211.

For Peer Review

Mashima Y, Kimura I, Yamamoto Y, Ohde H, Ohtake Y, Tanino T, Tomita G & Oguchi Y (2003): Optic disc excavation in the atrophic stage of Leber's hereditary optic neuropathy: comparison with normal tension glaucoma. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **241**: 75-80.

Meyerson C, Van Stavern G & McClelland C (2015): Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. Clin Ophthalmol **9**: 1165-1176.

Nagai A, Nakamura M, Kusuhara S, Kanamori A & Negi A (2005): Unilateral manifestation of Leber's hereditary optic neuropathy after blunt ocular trauma. Jpn J Ophthalmol **49**: 65-7.

Newman NJ (2005): Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. Am J Ophthalmol **140**: 517-523.

Nikoskelainen E, Sogg RL, Rosenthal AR, Friberg TR & Dorfman LJ (1977): The early phase in Leber hereditary optic atrophy. Arch Ophthalmol **95**: 969-78.

Puomila A, Hämäläinen P, Kivioja S, Savontaus ML, Koivumäki S, Huoponen K & Nikoskelainen E (2007): Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. Eur J Hum Genet **15**: 1079-1089.

Shoji T, Sakurai Y, Chihara E, Nishikawa S & Omae K (2009): Reference intervals and discrimination values of the Lanthony desaturated D-15 panel test in young to middle-aged Japanese army officials: the Okubo Color Study Report 1. Eye (Lond) **23**: 1329-1335.

Smith J, Hoyt W & Susac J (1973): Ocular fundus in acute Leber optic neuropathy. Arch Ophthalmol **90**: 349-354.

Spaide RF, Fujimoto JG & Waheed NK (2015): Image artifacts in optical coherence angiography. Retina **35**: 2163-2180.

Spruijt L, Kolbach DN, de Coo RF, Plomp AS, Bauer NJ, Smeets HJ & de Die-Smulders CE (2006): Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. Am J Ophthalmol **141**: 676-682.

Sugisaka E, Ohde H, Shinoda K & Mashima Y (2007): Woman with atypical unilateral Leber's hereditary optic neuropathy with visual improvement. Clin Exp Ophthalmol **35**: 868-70.

Takayama K, Ito Y, Kaneko H, Kataoka K, Ra E & Terasaki H (2017): Optical coherence tomography angiography in Leber hereditary optic neuropathy. Acta Ophthalmol **95**: e344-e345.

For Peer Review

Y-W-Man P, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM & Chinnery PF (2014): The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. Am J Hum Genet **72**: 333-339.

For Peer Review

FIGURE LEGENDS

Figure 1. High resolution reconstruction of the peripapillary vascular network within the retinal nerve fibre layer (RNFL) in subjects carrying mutations causing Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and healthy controls. Right and left eye is shown for each individual comprising of an OCT-A image, RNFL measurements plotted against SD-OCT internal normative database (red band pathological values, yellow borderline, green normal thickness) and 22° central visual field established by automated perimetry. In case 1 and 2 with severe LHON there is an apparent bilateral capillary dropout (arrows) corresponding to pathological RNFL temporal thinning and visual field loss (A-D). In individual 3 with unilateral LHON presentation 14 months after the onset, right eye scans centred on the papilla could not be obtained due to a delineation error, slight decentring temporally suggests capillary dropout, however it cannot be excluded that this is due to an artefact, RNFL and visual field are normal (E); capillary dropout can be noticed in the affected left eye showing also RNFL thinning and mild visual field defects (F). Normal radial peripapillary network, RNFL and visual field in three unaffected mtDNA carriers (individuals 4, 5 and 6) (G-L) and healthy controls (M-S).

Figure 2. Optic head nerve imaging in individual 3, 27 days after presenting with vision loss due to Leber hereditary optic neuropathy. Photographs of the right (A) and left (B) optic nerve head, note blurred edges indicating pseudoedema in the left eye. Visual field 22° from central fixation in the right eye (C) evaluated as normal, while in the left eye (D), profound defects were documented. Retinal nerve fibre layer measurements showed normal curve in the right eye (E) and significant increase in thickness in the left eye (F) in the superior, inferior and nasal quadrant. Horizontal (G) and vertical (H) SD-OCT cross-sectional images of the left optic head nerve and its peripapillary area. Note severe swelling except for the temporal quadrant.

For Peer Review

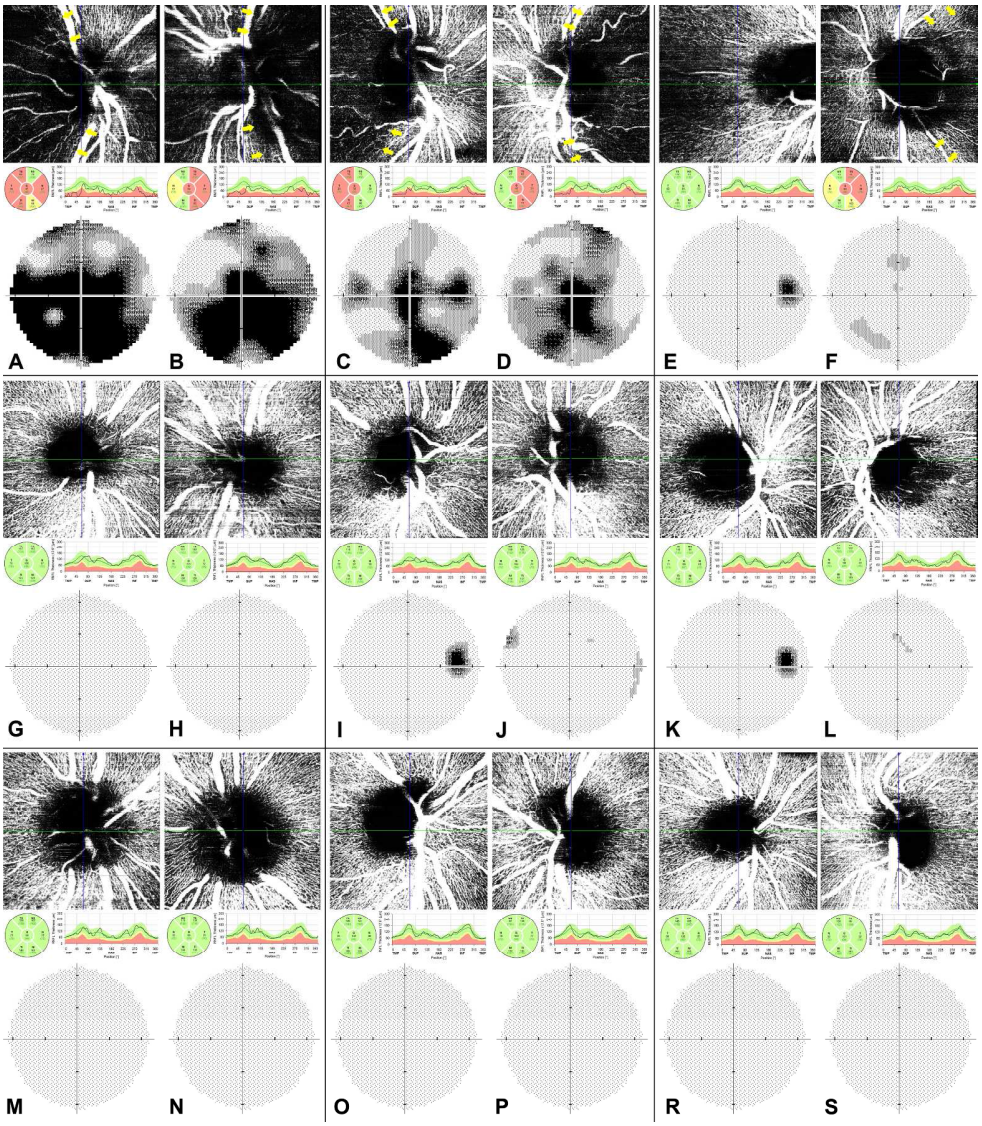


Figure 1. High resolution reconstruction of the peripapillary vascular network within the retinal nerve fibre layer (RNFL) in subjects carrying mutations causing Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and healthy controls. Right and left eye is shown for each individual comprising of an OCT-A image, RNFL measurements plotted against SD-OCT internal normative database (red band pathological values, yellow borderline, green normal thickness) and 22° central visual field established by automated perimetry. In case 1 and 2 with severe LHON there is an apparent bilateral capillary dropout (arrows) corresponding to pathological RNFL temporal thinning and visual field loss (A-D). In individual 3 with unilateral LHON presentation 14 months after the onset, right eye scans centred on the papilla could not be obtained due to a delineation error, slight decentring temporally suggests capillary dropout, however it cannot be excluded that this is due to an artefact, RNFL and visual field are normal (E); capillary dropout can be noticed in the affected left eye showing also RNFL thinning and mild visual field defects (F). Normal radial peripapillary network, RNFL and visual field in three unaffected mtDNA carriers (individuals 4, 5 and 6) (G-L) and healthy controls (M-S).

979x1121mm (72 x 72 DPI)

For Peer Review

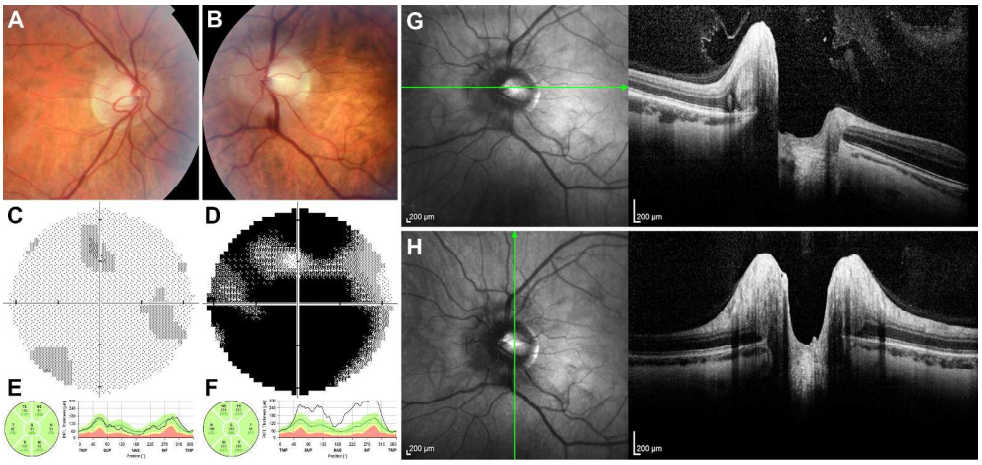


Figure 2. Optic head nerve imaging in individual 3, 27 days after presenting with vision loss due to Leber hereditary optic neuropathy. Photographs of the right (A) and left (B) optic nerve head, note blurred edges indicating pseudoedema in the left eye. Visual field 22° from central fixation in the right eye (C) evaluated as normal, while in the left eye (D), profound defects were documented. Retinal nerve fibre layer measurements showed normal curve in the right eye (E) and significant increase in thickness in the left eye (F) in the superior, inferior and nasal quadrant. Horizontal (G) and vertical (H) SD-OCT cross-sectional images of the left optic head nerve and its peripapillary area. Note severe swelling except for the temporal quadrant.

1490x695mm (72 x 72 DPI)

Review

Table 1 Clinical and demographical details of subjects carrying mutations causing Leber hereditary optic neuropathy included into the study. Pathological values are shown in bold.

ID/gender/ age	Mutation	Idebenone treatment/ start after the onset	Onset		Time span after onset	RNFL global/temporal quadrant (µm)		BCVA		Colour vision		Contrast sensitivity		Optic head nerve description	
			RE	LE		RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE
1/M/26 yrs	m.11778G>A	N	19 yrs and 8 mon	20 yrs and 2 mon	6 yrs	**47/18**	**53/34**	**CF**	**0.016**	**D**	**D**	**D**	**0.00**	Pallor more pronounced temporally	Pallor more pronounced temporally
2/M/22 yrs	m.11778G>A	Y/22 mon	20 yrs and 1 mon	20 yrs and 2 mon	2 yrs and 3 mon	**58/23**	**62/23**	**0.05**	**0.05**	**D**	**D**	**0.75**	**0.75**	Temporal pallor	Temporal pallor
3/M/30 yrs	m.14484T>C	Y/1 mon	N	29 yrs and 3 mon	1 yrs and 2 mon	93/82	**63/39**	1.0	**0.87**	P	**D**	1.65	**1.20**	Normal	Temporal pallor
4/M/11 yrs	m.11778G>A	N	N	N	N/A	100/70	101/72	1.0	1.0	P	P	1.65	1.65	Normal	Normal
5/M/18 yrs	m.11778G>A	N	N	N	N/A	97/72	102/72	1.0	1.0	P	P	1.50	1.50	Normal	Normal
6/F/41 yrs	m.11778G>A	N	N	N	N/A	96/71	90/73	1.0	1.0	P	P	1.65	1.65	Normal	Normal

M = male, F = female, yrs = years, mon = months, Y= yes, N = none, N/A = not applicable, RE = right eye, LE = left eye, RNFL = retinal nerve fiber layer, BCVA = best corrected visual acuity, CF = counting fingers, D = defect, P = pass

For Peer Review

Supplement 7]

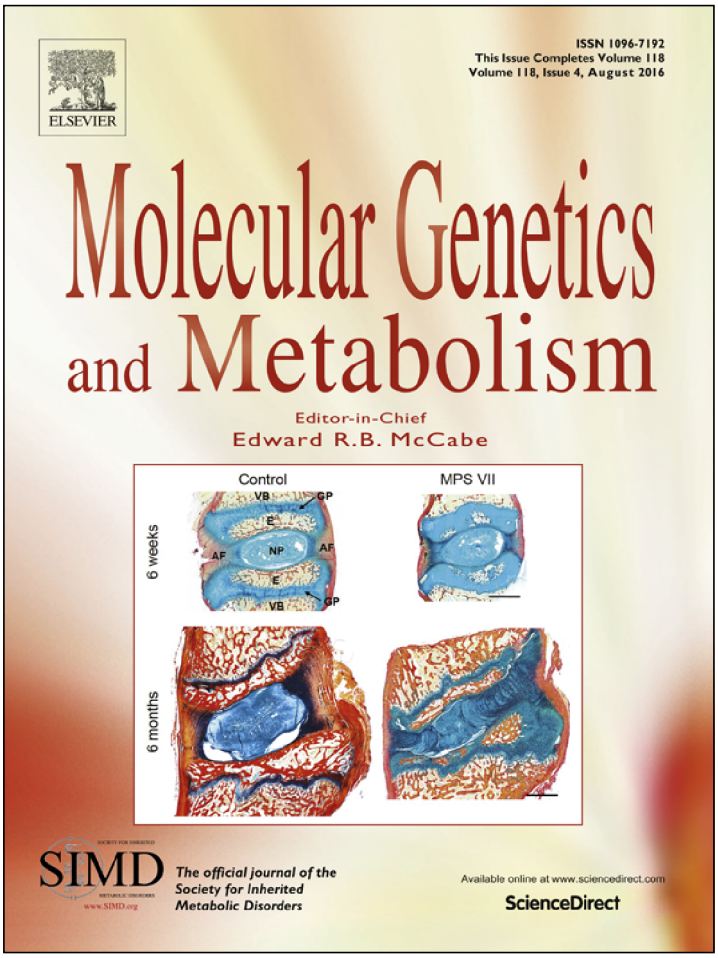
Dvorakova, V., ***Kolarova, H.****, Magner, M., Tesarova, M., Hansikova, H., Zeman, J., Honzik, T.*

The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers.

Mol Genet Metab 2016 118(4), 288–295.

[IF: 3,769]

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

http://www.elsevier.com/authorsrights

Author's Personal Copy

Molecular Genetics and Metabolism 118 (2016) 288–295

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers

V. Dvorakova [1], H. Kolarova [2], M. Magner [3], M. Tesarova [4], H. Hansikova [4], J. Zeman [3], T. Honzik *[,5]

Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, General University Hospital in Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 June 2016
Received in revised form 4 June 2016
Accepted 5 June 2016
Available online 6 June 2016

Keywords:
MELAS
m.3243A>G
Heteroplasmy
Natural course
Fully expressed phenotype
Oligosymptomatic patients

ABSTRACT

Background: Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes syndrome (MELAS) is a common mitochondrial disorder with varying multisystemic clinical manifestation. We present a comprehensive clinical picture of 50 Czech m.3243A>G carriers with emphasis on the sequence of symptoms in symptomatic patients.

Results: Symptoms developed in 33 patients (66%) and 17 carriers remained unaffected (34%). The age of onset varied from 1 month to 47 years of age, with juvenile presentation occurring in 53% of patients. Myopathy was the most common presenting symptom (18%), followed by CPEO/ptosis and hearing loss, with the latter also being the most common second symptom. Stroke-like episodes (SLE) occurred in fourteen patients, although never as a first symptom, and were frequently preceded by migraines (58%). Rhabdomyolysis developed in two patients. The second symptom appeared 5.0 ± 8.3 years (range 0–28 years) after the first, and the interval between the second and third symptom was 2.0 ± 6.0 years (range 0–21 years). Four of our patients remained monosymptomatic up to 12 years of follow-up. The sequence of symptoms according to their time of manifestation was migraines, myopathy, seizures, CPEO/ptosis, SLE, hearing loss, and diabetes mellitus. The average age at death was 32.4 ± 17.7 years (range 9–60 years) in the juvenile form and 44.0 ± 12.7 years (range 35–53 years) in the adult form. Some patients with SLE harboured very low heteroplasmy levels in various tissues. No threshold for any organ dysfunction could be determined based on these levels.

Conclusions: Sufficient knowledge of the timeline of the natural course of MELAS syndrome may improve the prediction and management of symptoms in patients with this mitochondrial disease.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

First described in 1984, MELAS syndrome (Mitochondrial myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) is one of the most common mitochondrial disorders [1]. The clinical variability of this maternally inherited disease is very broad, ranging from severe forms with manifestations early during the neonatal and infant age periods [2–4] to milder and incomplete forms presenting as late as the sixth decade of life [5]. The severity of the disease was reported to be depending on the level of mutated DNA (heteroplasmy) in affected organs [6]. Twenty-nine point mutations and one deletion in the mitochondrial DNA (mtDNA) are associated with the disease. Mutation m.3243A>G in the mitochondrial gene *MTTL1*, which encodes the tRNA$^{Leu(UUR)}$ described by Goto et al. [7], has a prevalence of 80%, followed by the mutations m.13513G>A, m.3271T>C and m.3243A>G (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1233/#MELAS.Molecular_Genetics). The carrier frequency for m.3243A>G is surprisingly high (236 per 100,000 in the Australian population) [8], which is in sharp contrast to the estimated incidence of affected patients (9–18 per 100,000) [9–11].

Originally reported cases presented primarily with exercise intolerance, seizures with stroke-like episodes (SLE) and sensorineural hearing loss [1,12,13]. Many other clinical features were later added to the list of clinical manifestations, including cardiomyopathy, chronic progressive external ophthalmoplegia (CPEO), ptosis, migraines, gastrointestinal impairment and diabetes mellitus (DM). Milder forms of MELAS syndrome are more frequently diagnosed currently, e.g. only 13 of 129 patients corresponded to the original description of MELAS given by Pavlakis in a recent UK MRC Mitochondrial Disease Patient Study [14].

Several cohorts characterizing the clinical symptoms of patients with MELAS syndrome were recently published [15–17]. However, no study focused on the timeline of the onset of various symptoms.

* Corresponding author at: Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 121 01 Praha 2, Czech Republic.
E-mail address: tomas.honzik@vfn.cz (T. Honzik).

[1] Preparation and drafting of the manuscript, patients clinical and laboratory data evaluation, revision of the literature, participation in the conception and design of the article.
[2] Participation in the conception and design of the article, revision of the literature, drafting the manuscript.
[3] Clinical investigation, critical revision of the article.
[4] Molecular biology and biochemistry, assistance in drafting the figures.
[5] Conceiving the article outline, conception and design of the manuscript, clinical investigation, draft of the manuscript and critical revision for important intellectual content. He is the guarantor of the article, accepts full responsibility for the work submitted and controls the decision to publish.

http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.06.003
1096-7192/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Author's Personal Copy

Therefore, the main objective of our study was to describe the sequence of the emerging symptoms of MELAS syndrome in a cohort of 50 individuals with the m.3243A>G mutation. In addition, we characterized the biochemical findings and the heteroplasmy across various tissue types. This characterization may help us to better understand the natural course of the disease and improve patient care.

2. Patients and methods

2.1. Group characterization

Fifty Czech individuals carrying the m.3243A>G mutation were included in the study. All these individuals were diagnosed between 1996 and 2015 by one centre – Department of Paediatrics and Adolescent Medicine in Prague and were routinely followed-up. Regular visits (at least once a year) included clinical and biochemistry assessments. Additional specific procedures (imaging of CNS and electrophysiological studies) were performed when needed. The clinical and laboratory data for these 50 Czech individuals with mutation in the *MTTL1* were collected and analysed in this retrospective study. The cohort included 17 males and 33 females from 22 unrelated families. A total of 33 patients (66%) were clinically affected probands, with at least one symptom frequently associated with MELAS. The remaining subjects, with a mean age of 36.2 ± 20.7 years (range 7–70), stayed on asymptomatic during their follow-up (mean 11.4, range 1–19 years). The mean age in the symptomatic group was 39.7 ± 17.6 (range 17–78 years), and the male to female ratio was 1:3.7. The presence of SLE in fourteen (42%) symptomatic patients characterized the fully expressed phenotype (FEP); the absence of SLE in nineteen (58%) symptomatic patients characterized the oligosymptomatic phenotype (OP). The division of patients into asymptomatic, OP and FEP was used for the evaluation of disease severity. The juvenile (onset <16 years) and adult (onset ≥16 years) forms were defined according to Mancuso et al. [16]. The group description is summarized in Table 1 (onset is unknown in one of our patients). Laboratory data were differentiated between the resting period and the time of metabolic derangement, and multiple patient inputs were averaged out. Diagnosis of peripheral neuropathy was based on abnormal nerve conduction studies. Heart failure was defined as left ventricular ejection fraction <40%. Informed consent was obtained from the patients or their parents before any biopsies or molecular analyses were performed.

2.2. Molecular genetic analyses

The heteroplasmy level of mtDNA mutations was determined by PCR-RFLP in all available samples. Blood analysis was performed in 45 patients, hair follicles were tested in 40 patients, buccal cells were tested in 21 patients, muscle was tested in 14 patients and urothelial epithelial cells (UEC) were tested in 9 patients. The mtDNA region between nucleotides m.3130 and m.3558 was amplified by PCR (Plain PP Master Mix, Top Bio, Czech Republic). After restriction digestion of the PCR products with the *ApaI* endonuclease (Thermo Scientific, USA), the resulting DNA fragments were separated on an Agilent High Sensitivity DNA Chip using the Agilent 2100 Bioanalyzer. For each sample, the intensities of the individual restriction fragments were determined using Agilent 2100 Expert Software (all Agilent Technologies, USA). The level of heteroplasmy was calculated as the percentage of fragment intensity corresponding to the mutated mtDNA molecule.

Table 1
Demographic data for 33 symptomatic m.3243A>G carriers.

	Total	Juvenile form	Adult form
Patients (male/female)	n = 33 (7/26)	n = 17 (6/11)	n = 15 (1/14)
Age of onset (years)	17.4 ± 12.9	7.4 ± 4.2	28.7 ± 9.3
Age of diagnosis (years)	28.2 ± 15.7	22.2 ± 14.7	34.1 ± 14.4
Current age (years)	39.7 ± 17.6	24.0 ± 8.0	42.0 ± 13.0
Deceased patients (% of total)	n = 11(33)	n = 9 (53)	n = 2 (13)
Age of death (years)	34.5 ± 16.2	32.4 ± 17.7	44.0 ± 12.7

2.3. Statistics

Percentages stated in paragraphs dedicated to clinical symptoms always express proportion of patients having a given symptom to all patients examined for such symptom. Differences among the asymptomatic, OP and FEP patients were tested by the approximative linear — by — linear association test, and differences between two groups of patients were tested by Wilcoxon tests. To examine the survival probability, a Kaplan-Meier estimator was used, accompanied by a log-rank test of difference. Parametric survival regression model was used to study differences in the onset of individual symptoms based on sex (women vs. men) and phenotype (juvenile vs. adult onset, fully expressed vs. oligosymptomatic). P-values less than 0.05 were considered statistically significant. Analyses were conducted using the R statistical package version 3.1.2.

3. Results

3.1. Disease onset

The mean age of onset in all symptomatic patients was 17.4 ± 12.9 years (range 1 month–47 years). The FEP patients manifested symptoms earlier (mean 10.9 ± 8.1 years, range 6 months–29 years) than the OP patients (mean 22.5 ± 13.9 years, range 1 month–47 years). The most frequent presenting symptoms were myopathy (muscle fatigue, myalgia, intolerance of exercise) in 18%, isolated ptosis in 16%, growth retardation and hearing loss in 13% and isolated CPEO in 11% of patients, followed by DM, failure to thrive, seizures, depression, central hypotonic syndrome and developmental delay. The time from disease onset to diagnosis ranged from 9 months to 44 years. Two patients were diagnosed prior to disease onset due to positive family history.

3.2. Clinical symptoms and disease progression

The clinical features of the symptomatic patients are summarized in Table 2. Overall, 19 patients (58%) manifested 4 or more symptoms, and only 4 (12%) remained monosymptomatic at the time of publication, with myopathy, ptosis or depression. The most frequent clinical finding noted in symptomatic patients was sensorineural hearing loss (25 patients, 76%). Myopathy was the second most common symptom in affected probands (19 patients, 56%). More than 45% of symptomatic patients presented with CPEO. In the FEP patients, SLE was always accompanied by at least two other symptoms and most frequently (71%) by 4 or more symptoms. The most common symptoms in the FEP patients, except for SLE, were sensorineural hearing loss (12 patients, 86%), seizures (12 patients, 86%), and myopathy (9 patients, 64%). Similarly, in the OP group, 9 patients (47%) presented 4 or more symptoms, although this number was more variable. Sensorineural hearing loss was also the most common clinical finding in the OP group (13 patients, 68%), followed by myopathy (10 patients, 53%) and gastrointestinal dysmotility (9 patients, 47%). The median time interval between the first and second symptom and the second and third symptom was 5.0 ± 8.3 years (range 0–28 years) and 2 ± 6.0 years (range 0–21 years), respectively. The most common second symptom was sensorineural hearing loss, which affected 19% of patients. SLE was reported as a second symptom in 10% and as a third symptom in 29% of patients. The sequence of symptoms according to their time of manifestation was as follows: migraines, myopathy, seizures, CPEO/ptosis SLE, hearing loss, and DM (Fig. 1).

We did not observe any difference in disease progression between FEP and OP and also the sequence of individual emerging symptoms was almost the same, only seizures ($p < 0.00005$) and sensorineural

Author's Personal Copy

Table 2
Clinical features in 33 symptomatic m.3243A>G carriers.

Clinical symptom	Total number of patients	Fully expressed patients	Oligosymptomatic patients
	33	14	19
	n	n	n
Neurological involvement			
Seizures	14	12	2
Migraines	10	7	3
Stroke-like episodes	14	14	0
Neuropathy	5	2	3
Pseudobulbar syndrome	6	2	4
Cerebellar symptomatology	5	3	2
Myopathy	19	9	10
Hearing			
Sensorineural hearing loss	25	12	13
Ocular involvement			
CPEO	15	8	7
Ptosis	12	6	6
Retrochiasmatic visual loss	5	5	0
Pigmentary retinal dystrophy	2	2	0
N. opticus atrophy	2	2	0
Psychiatric disturbances			
Intellectual disability	12	8	4
Depression	7	5	2
Internal organ involvement			
Cardiomyopathy	8	5	3
Wolf-Parkinson-White syndrome	1	1	0
Diabetes mellitus	14	7	7
Thyroid gland disease	6	1	5
Gastrointestinal dysmotility	15	6	9
Others			
Short stature	12	7	5

CPEO: chronic progressive external ophthalmoplegia.

hearing loss ($p = 0.0418$) manifested earlier in FEP. Other main symptoms (myopathy, CPEO/ptosis, diabetes mellitus and migraines) showed quite the same occurrence when FEP compared to OP and no statistical difference was found. The disease progression did not differ between juvenile and adult form, however, some symptoms occurred earlier in the juvenile form – sensorineural hearing loss ($p = 0.0004$), myopathy ($p = 0.0021$) and diabetes mellitus ($p = 0.0021$). Also no influence of gender on the disease progression was found. Only two of the main symptoms included in the sequence analysis differed based on sex – men had earlier onset of seizures ($p = 0.0139$) and women had earlier onset of diabetes mellitus ($p = 0.0227$). Also men with juvenile form presented earlier hearing impairment ($p = 0.0046$).

3.3. Survival

Overall, 11 symptomatic patients (33%) died during our follow-up. The most frequent MELAS-related causes of death were heart failure in patients with cardiomyopathy and infection with metabolic derangement that was irresponsive to therapy. Suicide due to depression was documented in one patient. A difference in survival probability was noted between the juvenile and the adult forms of the disease, $p = 0.005$ (Fig. 2). The average age at death was 32.4 ± 17.7 years (range 9–60 years) in the juvenile patient group and 44.0 ± 12.7 years (range 35–53 years) in the adult patient group (Fig. 2, Table 1).

3.4. Organ involvement

3.4.1. Neurological involvement

Neurological symptoms in our patients included SLE (42%), seizures (42%), neuropathy (38%), pseudobulbar syndrome (18%) and cerebellar symptomatology (15%). Cognitive impairment was documented in 12 symptomatic patients (36%). Of the 14 patients with SLE, 58% suffered from migraines. However, of the patients with migraines, 70% later developed SLE. Six patients suffered from recurrent SLE (up to five episodes) regardless of age at disease onset. The age at which the episodes manifested differed greatly, ranging from 9–49 years. The seizures were mostly generalized tonic-clonic episodes, although West syndrome and myoclonic epilepsy were present in one patient each. Status epilepticus was not observed. MRI study results were available for 14 patients. All patients with SLE had the characteristic radiological features of MELAS, including ischaemic lesions located primarily in the parietal and occipital lobes that did not overlap with areas of cerebral vasculature. Cerebellar atrophy was noted in 8 patients, and cortical atrophy in 5 patients. Basal ganglia calcifications were present in two patients. The MR imaging pattern of a hyperintense symmetrical lesion in the basal ganglia on T2-weighted imaging was compatible with the diagnosis of Leigh syndrome in a girl who died at 18 years of age. Thirteen patients with clinically suspected neuropathy were EMG tested. Peripheral neuropathy with axonal lesions was found in 3 patients, myogenic lesions in 5 patients and combined neurogenic and myogenic lesions in 2 patients. Three patients had normal EMG findings.

Myopathy was the most frequent symptom at onset (18%). Sixteen individuals complained of reduced muscle strength and exercise intolerance. Muscle pain was documented in two patients and a waddling gait with a positive Gower's sign in another two patients.

Two patients developed rhabdomyolysis. The first patient was a boy with the juvenile fully expressed form, who developed rhabdomyolysis during his 4th SLE at the age of 16 years. His creatine kinase level at the time was 29,352.9 U/L (controls <170.6), myoglobin was 789 μg/L (controls <92), LD was 35.7 μkat/L (controls <3.8), and lactate was 5.3 mmol/L (controls <2.1). His resting creatine kinase (CK) level ranged between 247.1–682.4 U/L. The second patient was a girl whose third symptom was an attack of rhabdomyolysis and acute myalgia (CK 6647.1 U/L, myoglobin 174 μg/L, and lactate 4.3 mmol/L) which developed at the age of 17 years. Her prior symptoms included CPEO and exercise intolerance. Her resting CK level ranged between 94.1–1417.6 U/L.

3.4.2. Psychiatric disturbances

Seven symptomatic patients (21%) developed psychiatric symptoms between the ages of 13 and 47 years. In all individuals, social functional impairment was evident, and disturbed cognitive function was present in four of these patients (another 8 patients had intellectual disability but without psychiatric involvement). Depression, as the most frequent psychiatric symptom, developed in seven patients. One patient also suffered from psychotic (schizophrenia-like) symptoms with hallucinations and organic amnestic syndrome, and another one suffered from declining cognitive function with confusional states. Depression was accompanied by anxiety in both of the above mentioned patients and by organic psychosyndrome or organic personality disorder in the other two patients. In one case, depression preceded a SLE, and in another patient, who committed suicide at 53 years of age, depression was the only symptom of MELAS. States of confusion occurred in three patients, requiring repeated hospitalisations.

3.4.3. Ocular findings

Ocular involvement was identified in 22 patients (67%). Chronic progressive ophthalmoplegia was documented in 15 individuals, ptosis in 12 individuals, usually in combination. Only 3 patients suffered from isolated CPEO and one from ptosis. Of the 5 patients (15%) who experienced retrochiasmal visual loss, including two with registrable blindness, 4 experienced defects related to SLE, and 1 experienced defects

Author's Personal Copy

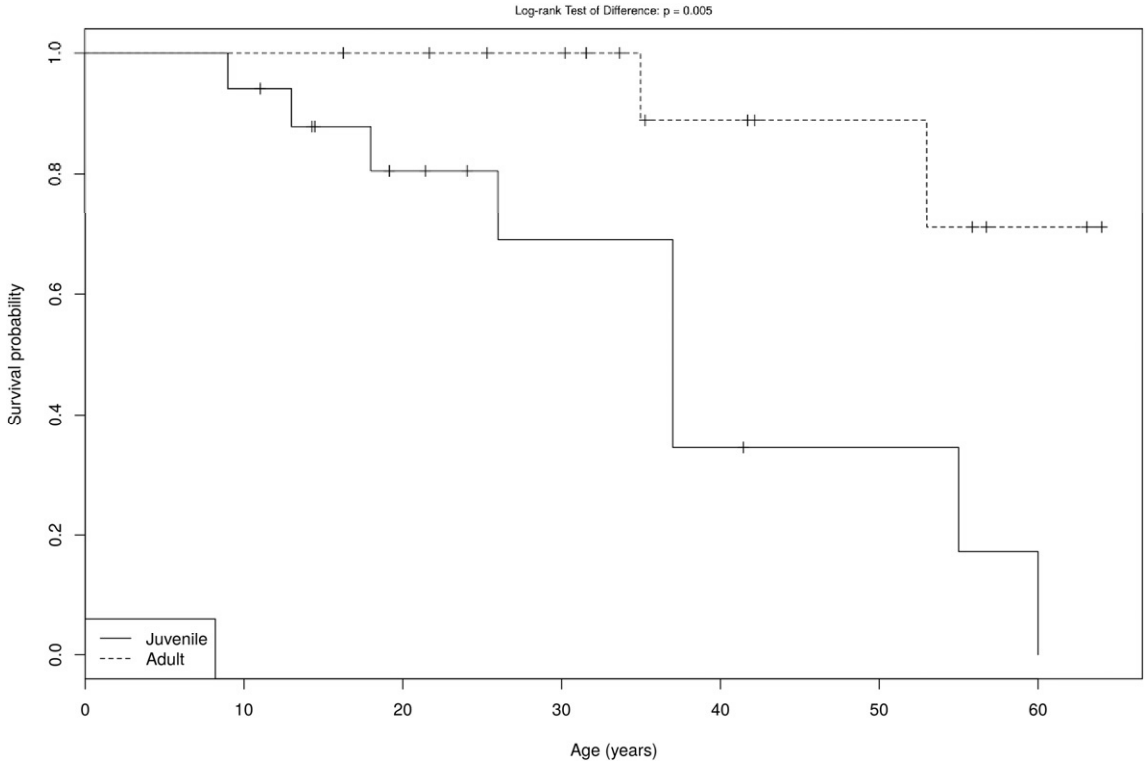


Fig. 2. Difference in survival probability in the juvenile and adult onset MELAS patients carrying the m.3243A>G mutation.

due to hypertensive angiopathy of the retinal artery. Atrophy of the optic nerve was detected in 2 patients (6%); both also manifested pigmentary retinal dystrophy. Patient-reported visual symptom mostly included altered visual acuity (10 patients, 30%), diplopia or blurred vision (3 patients, 9%).

3.4.4. Heart

Cardiomyopathy was confirmed by echocardiography in 8 individuals (24%), of whom 7 demonstrated hypertrophic cardiomyopathy and 1 demonstrated dilated cardiomyopathy. In three patients, hypertrophic cardiomyopathy resulted in heart failure. Wolff-Parkinson-

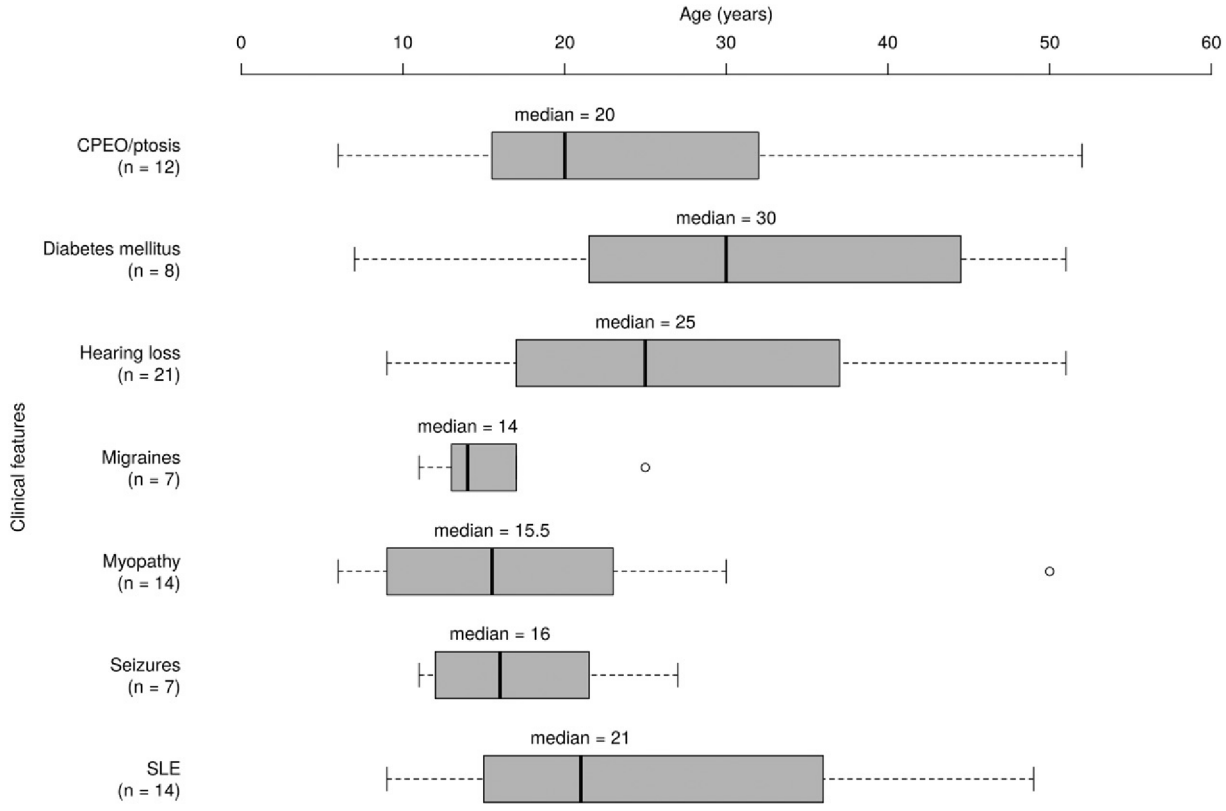


Fig. 1. The sequence of emerging symptoms throughout life span in 33 symptomatic MELAS patients. CPEO: chronic progressive ophthalmoplegia, SLE: stroke-like episodes.

Author's Personal Copy

White (W-P-W) syndrome was present in 1 patient with heart failure due to dilated cardiomyopathy.

3.4.5. Other involvement

Fourteen patients (42%) had diabetes mellitus. Type I occurred in 2 cases, type II occurred in 11 cases (33%), and in one case, the type remained unidentified. The type II patients had normal body mass index (BMI), and there was no association with obesity. Overall, 50% of adult and 35% of juvenile patients developed compromised glucose tolerance or DM. Of the 6 patients (18%) who suffered from thyroid disease, 1 had a hyperfunctioning thyroid and 4 had a hypofunctioning thyroid gland, of which one case was caused by hypopituitarism. One patient had thyroid carcinoma at the age of 61 years. Short stature was present in 12 patients (36%), with hypopituitarism documented in one patient. Height in these patients ranged from −2.3 to −3.4 SDS. Symptoms of gastrointestinal dysmotility were reported by fifteen patients and included dyspepsia, stomach ache and anorexia, with occasional nausea or vomiting.

3.5. Biochemical analyses

Kidney function was impaired in 2 patients with abnormal urea (21.9 ± 9.1; normal <8 mmol/L) and creatinine levels (116.5 ± 0.5; normal <110 μmol/L). Uric acid was normal in all patients. Hepatopathy was documented in nine patients and did not show severe derangement. Aspartate aminotransferase (AST) was elevated in 43% of patients (70.6 ± 23.5; normal <42.3 U/L); alanine aminotransferase (ALT) in 23% of patients (82.4 ± 17.7; normal <45.9 U/L); and gamma-glutamyl transferase in only one patient (1.7; normal <0.84 μkat/L).

Muscle enzyme levels and metabolic test values were differentiated based on the resting period and the time of metabolic derangement during a SLE or an infection. Muscle enzyme levels during rhabdomyolysis were excluded from this analysis. CK was elevated in 33% of patients (488.2 ± 247.1; normal <170.6 U/L) and myoglobin was elevated in one patient (168.2; normal <92 μg/L) during the resting period. During metabolic derangement, abnormal levels were observed in only half of the patients (CK 517.6 ± 158.8 U/L and myoglobin 155 ± 38 μg/L). Lactate levels were elevated in 62% of patients in the blood (4 ± 1.6; normal <2.2 mmol/L) and in 71% of patients in the urine (169 ± 189; normal <30 mmol/mol creatinine) during the resting period. We had only six and five patient measurements for blood (5.9 ± 3.4 mmol/L) and urine lactate samples (1713.9 ± 2307 mmol/mol creatinine) during metabolic derangement, respectively. Lactate was measured in the cerebrospinal fluid in two patients, with values of 4.2 and 11.8 mmol/L. Metabolic work-ups showed high levels of serum alanine in both analyses at rest in 61% of patients (650 ± 152.6; normal <500 μmol/L) and during metabolic derangement in 40% of patients (679 ± 24.8 μmol/L). Other serum amino acid measurements did not show significant changes. Excretion of organic acids in the urine was repeatedly without abnormalities.

Muscle biopsy was performed in 14 patients (6 FEP and 8 OP patients), and in 6 of the obtained specimens, histochemical analysis was performed. Ragged red fibres (RRF) were observed in all 6 affected specimens, and 3 also showed focal subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase reaction product and cytochrome *c* oxidase (COX) negative muscle fibres. The activities of the respiratory chain complexes of isolated muscle mitochondria were measured in 9 patients, and decreased activities were found in 5 (Complex I was decreased in 3 patients; Complex III in 3; Complex I + III in 4; and Complex IV in 2 patients).

3.6. Heteroplasmy levels

We observed significant positive relationship between heteroplasmy levels and disease severity in UEC, hair and blood ($p = 0.022$, resp. $p = 0.023$, resp. $p = 0.003$). There was great overlap in the heteroplasmy levels of the asymptomatic and symptomatic patients (Fig. 3). No threshold for clinical manifestation was determined, because some of the FEP patients harboured very low heteroplasmy levels in various tissues (e.g. 4% in hair or 8% in blood). The most promising predictive factor was UEC (ROC analysis, AUC = 0.833). No significant correlation between heteroplasmy and disease severity was observed in the muscle specimens or buccal smears. No significant difference was observed in heteroplasmy levels in various tissues in the OP and FEP patients (data not shown). The levels of heteroplasmy were higher in muscle than in rapidly dividing tissues, such as blood or the buccal mucosa. The muscle heteroplasmy levels did not differ in patients with/without myopathy ($p = 0.2195$, Wilcoxon test) and also the level of muscle heteroplasmy in patient with rhabdomyolysis was not significantly higher than in patients without rhabdomyolysis but present myopathy.

4. Discussion

The current report represents a retrospective cohort characterization of 50 individuals carrying the m.3243A>G mutation. Our aim was to provide comprehensive data on MELAS-related phenotype, with a particular emphasis on the natural chronological course of the disease, as well as its biochemical characteristics and heteroplasmic status across various tissue types. We noted considerable clinical diversity among individuals with the m.3243A>G mutation, whose presentations ranged from asymptomatic to life-threatening conditions, of which the latter often resulted in early death. To our knowledge, this is the first description of the sequence of symptoms caused by this disease.

Thirty-three of fifty m.3243A>G mutation carriers were symptomatic; the remaining seventeen individuals displayed no symptoms and were denoted as dormant carriers according to de Laat et al. [17]. The number of patients with SLE was 42% of symptomatic patients (28% of all m.3243A>G carriers). This is close to the findings of Mancuso (41%) [16] and Kaufmann (37%) [18], but higher than in other studies (20% in Nesbitt [14] and 23% in Chin [15]). This reflects the clinical heterogeneity among m.3243A>G mutation carriers.

Four patients remained monosymptomatic (ptosis, myopathy, and depression) during our follow-up (4–12 years), and only one patient presented the specific maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) phenotype. MIDD was reported to be far more prevalent than MELAS despite less frequent referrals to specialized centres [17]. Nevertheless, because the intersymptom interval reached up to 28 years in our group, the development of additional features associated with DM and deafness cannot be excluded. We therefore propose that oligosymptomatic MELAS, rather than pure MIDD due to m.3243A>G, should be used to describe these patients.

The mean age of onset was 17.4 ± 12.9 years, and 53% of patients belonged to the juvenile group, which corresponds to the studies of Ma et al. [19], Chae et al. [20] and Mancuso et al. [16]. Interestingly, three of our patients presented at a very early age – 1 month, 6 months and two years, respectively. Such an early manifestation is a rather rare finding compared with the literature [16,21,22], as disease onset during the neonatal period has been reported in only two patients thus far [3,4]. Ciafaloni et al. [23] observed that although the majority of patients (62%) presented before 15 years of age, early development (reaching child developmental milestones) was normal in 86% of these patients. Kaufman et al. [22] noted that in patients with MELAS, a history of early developmental problems was associated with an earlier onset of MELAS specific symptoms. This is consistent with our observations. The first patient, with a non-significant perinatal history, manifested hypotonia at the age of 1 month, developed hypsarrhythmia at 10 months and died at the age of 9 years. Similarly, the second patient presented with developmental delay at 6 months of age, demonstrated seizures and SLE at twelve years of age and ultimately died at age 13. The third of our patients had short stature and failed to thrive in childhood. As an initial symptom, she manifested dilated cardiomyopathy

Author's Personal Copy

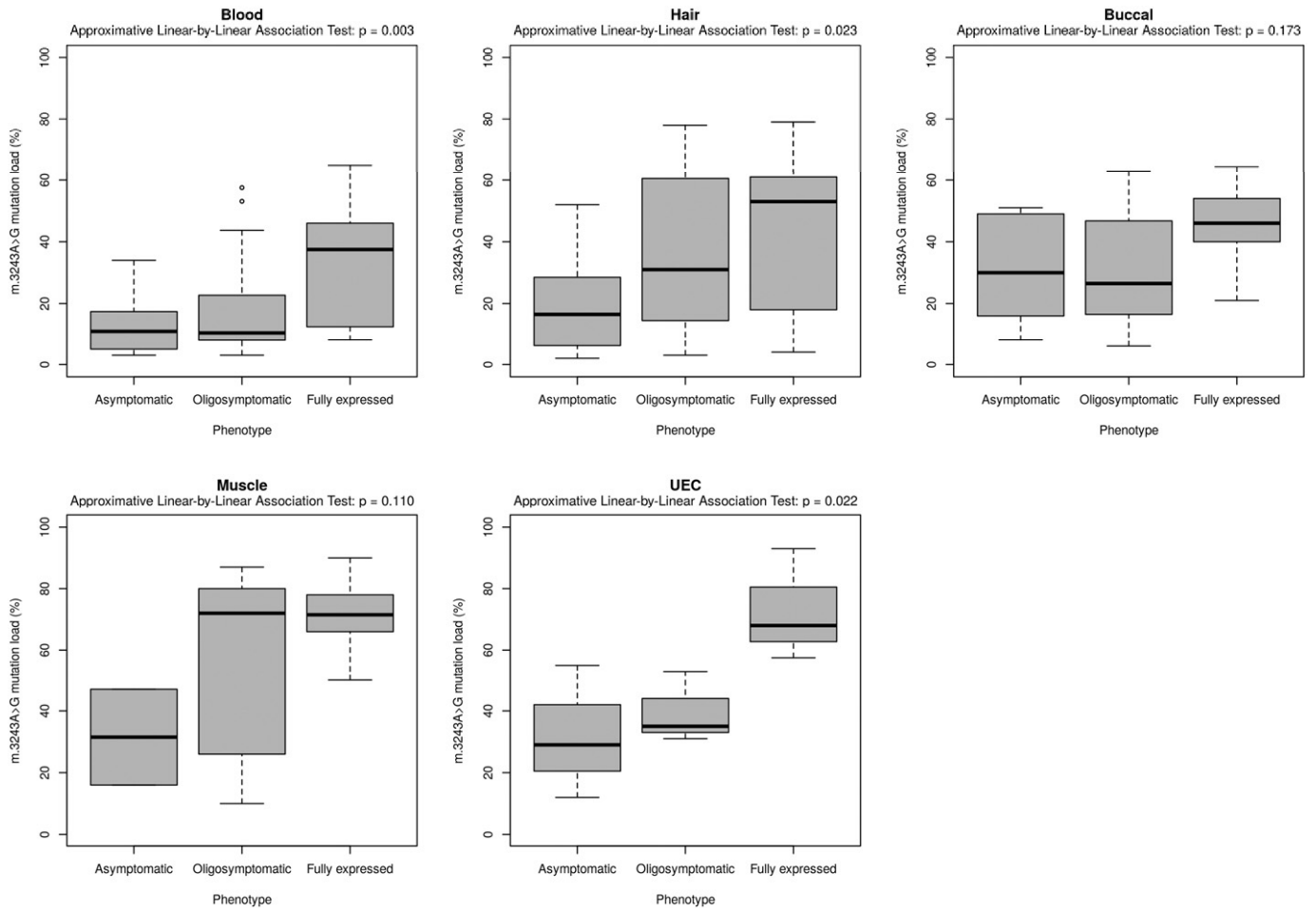


Fig. 3. The m.3243A>G mutation load (heteroplasmy) in various tissues in asymptomatic, oligosymptomatic and fully expressed MELAS patients. UEC: urothelial epithelial cells.

and W-P-W syndrome and died due to metabolic derangement secondary to SLE at the age of 18 years.

A quite broad variety of intersymptom delay was observed in our cohort (5.0 ± 8.3 years between 1st and 2nd, 2 ± 6.0 years between 2nd and 3rd symptom). Some patients even developed only one symptom (depression, ptosis, and myopathy) and it could take up to 28 years for the second symptom to come. What seems to be a case in mitochondrial disease such as MELAS syndrome is that any symptom from the broad phenotypic spectrum may come first and stay isolated for a long interval of time. Such information is valuable since only data on migraines as an isolated symptom in MELAS were published [24–26] and it indicates us the importance of vigilance during lifelong follow-up.

The association of migraines with SLE has been discussed in many publications [18,19,27,28]. In our patients with migraines, 70% later manifested SLE. We therefore consider migraine a risk factor for SLE, in contrast to Mancuso et al. [27]. Notably, migraines were very early emerging symptom in our cohort of patients, presenting before 17 years of age in all cases.

Rhabdomyolysis without a trigger does not belong in the typical MELAS phenotype and has been reported seven times in the English literature, to our knowledge [29–35]. Because we observed moderate rhabdomyolysis in another two patients, we would like to emphasize the importance of inclusion of mitochondrial disorders in the differential diagnosis of rhabdomyolysis. The level of muscle heteroplasmy in one of our patients did not differ from other patients with myopathy in our cohort. Also the muscle heteroplasmy levels varied greatly (40–80%) in patients with rhabdomyolysis reported so far. Such information may divert us from performing such an invasive procedure as muscle biopsy in order to obtain possible information about the severity of muscle involvement.

In seven patients (21%), a range of psychiatric disturbances due to encephalopathy were observed. In study by Mancuso et al. [27] 63% of patients with various mitochondrial disorders developed psychiatric disease, the majority of them fulfilled the criteria for major depressive episodes (93%). The next most common disorder was agoraphobia and/or panic disorder, but such findings were not observed in our group. Other diagnoses were similarly observed in our patient, including suicidal intention, anxiety disorder, and psychotic features. In another report, the lifetime prevalence of psychiatric disorders among patients with a mitochondrial mutation was 47% [36]. A low incidence of psychiatric symptoms in our cohort of patients corresponds to otherwise healthy Czech population – lifetime prevalence of psychiatric disorders in the adult population of the Czech Republic is reported to be 27% (30% women, 24% men) [37]. In comparison with the literature our data show an apparently overlooked problem with the need of proper follow-up and diagnosis.

In our study, cardiomyopathy was reported in 24% of patients carrying the m.3243A>G mutation. All but one patient had the hypertrophic type. The majority of authors confirm that patients with MELAS have an increased risk of developing hypertrophic cardiomyopathy, which ranges from 9% to 44% [15–17]. Moreover, patients with the m.3243A>G mutation have a high incidence of cardiac death and life-threatening adverse events associated with left ventricular hypertrophy [38]. This is consistent with our observations as three of our patients manifested serious cardiac failure, of which one ultimately died. In one patient with dilated cardiomyopathy, W-P-W syndrome was an incidental finding and its diagnosis preceded the diagnosis of MELAS. W-

Author's Personal Copy

P-W syndrome represents a frequent finding among patients with MELAS syndrome. Fayssoil [39] observed W-P-W in 13% of individuals carrying the m.3243A>G mutation, and in the study of Okajima et al. [40], the incidence was even higher (27%).

One of the most common endocrinological abnormalities in MELAS is DM. It has been estimated that in adults carrying the m.3243A>G mutation, the prevalence of MELAS is as high as 50%, and conversely, 1–3% of individuals with DM harbour the m.3243A>G mutation, which would make it the most common mutation associated with DM [17,41–43]. In our group, 42% of the symptomatic patients suffered from DM, which was more likely to develop in the adult group. Only 2 of 14 cases suffered from type I diabetes, which is consistent with the results of El-Hattab et al. [44], who indicated that fasting insulinopaenia is present only in a minority of diabetic patients with the m.3243A>G mutation. The high frequency of DM in our group supports the necessity of considering MELAS in families with diabetes mellitus manifesting along with mtDNA inheritance patterns [45]. Another common complication of MELAS is hypothyroidism, of which the incidence was approximately 12% in the symptomatic group. Surprisingly, one patient presented with hyperthyroidism, which is a rather rare complication of MELAS and has been reported in only three cases thus far [46–48]. It has been hypothesized that thyroid disease itself can influence the progression of MELAS. Due to increased mitochondrial oxygen consumption, thyroid hormones can lower the threshold of heteroplasmy [46]. This is consistent with our observations of a patient who died at the age of 18 years manifesting hyperthyroidism and severe multisystemic involvement. Patients with MELAS should be monitored for the development of hyperthyroidism, and similarly, treatment for hypothyroidism should be carefully monitored [46].

Detailed biochemical findings have not been published in previous studies [18], nor have the possible differences between the resting state and the time of metabolic derangement. In our cohort of patients, muscle enzymes were elevated in 33% and 50% of patients during the resting period and metabolic derangement, respectively. Increased lactate levels were more frequently observed in the urine (71%) than in the blood (62%) during the resting period, making urine lactate a more reliable marker for disease diagnosis. Metabolic work-ups showed high peaks of alanine levels during both the resting and the derangement periods.

We observed a positive relationship between disease severity and mutant mtDNA levels in some (UEC, hair and blood) but not other (buccal smears and muscle) tissues. High overlap between the asymptomatic and symptomatic patients was found in all tissues. A heteroplasmy level over 50% in any tissue was associated with clinical symptoms, although lower values did not exclude symptoms. Therefore, no clear threshold for disease manifestation could be determined. Even the value of heteroplasmy as a predictive factor for the discrimination of the OP and FEP forms was low, and we found no significant differences in heteroplasmy in any tissue. The relationship between heteroplasmy and the occurrence of particular symptoms was thus not always straightforward, as seen for myopathy, CPEO, and deafness in the study by Chinnery et al. [6].

In conclusion, we present comprehensive clinical and laboratory data for 50 individuals with the m.3243A>G mutation, as well as information focusing specifically on the sequence of symptoms. Migraines, myopathy, seizures and SLE were slightly more frequent in the younger age group. Although MELAS syndrome is considered a multiorgan disease, our results show that it should be taken into consideration even in mono- and oligosymptomatic patients.

Conflict of interest

All authors confirm that they have no competing interests to declare.

Details of ethics approval

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association. Due to the nature of the study, no ethical approval was requested from the local ethics committee.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (MZ CR AZV 16-32341A, RVO-VFN 64165), the Grant Agency of the Czech Republic (14-36804G), and by Charles University in Prague (GAUK 38515/2015, PRVOUK P24/LF1/3, UNCE 204011/2012, SVV 260256/2016). The authors are thankful to Vaclav Capek for the statistical treatment of the data.

References

[1] S.G. Pavlakis, P.C. Phillips, S. DiMauro, D.C. De Vivo, L.P. Rowland, Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome, Ann. Neurol. 16 (1984) 481–488.
[2] T. Kanaumi, S. Hirose, Y. Goto, E. Naitou, A. Mitsudome, An infant with a mitochondrial A3243G mutation demonstrating the MELAS phenotype, Pediatr. Neurol. 34 (2006) 235–238.
[3] S.B. Wortmann, R.J. Rodenburg, A.P. Backx, E. Schmitt, J.A. Smeitink, E. Morava, Early cardiac involvement in children carrying the A3243G mtDNA mutation, Acta Paediatr. 96 (2007) 450–451.
[4] T. Honzik, M. Tesarova, M. Magner, J. Mayr, P. Jesina, K. Vesela, L. Wenchich, K. Szentivanyi, H. Hansikova, W. Sperl, J. Zeman, Neonatal onset of mitochondrial disorders in 129 patients: clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis, J. Inherit. Metab. Dis. 35 (2012) 749–759.
[5] A. Vanniarajan, D. Nayak, A.G. Reddy, L. Singh, K. Thangaraj, Clinical and genetic uniqueness in an individual with MELAS, Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 141B (2006) 440–444.
[6] P.F. Chinnery, N. Howell, R.N. Lightowlers, D.M. Turnbull, Molecular pathology of MELAS and MERRF. The relationship between mutation load and clinical phenotypes, Brain 120 (Pt 10) (1997) 1713–1721.
[7] Y. Goto, I. Nonaka, S. Horai, A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies, Nature 348 (1990) 651–653.
[8] N. Manwaring, M.M. Jones, J.J. Wang, E. Rochtchina, C. Howard, P. Mitchell, C.M. Sue, Population prevalence of the MELAS A3243G mutation, Mitochondrion 7 (2007) 230–233.
[9] P.F. Chinnery, M.A. Johnson, T.M. Wardell, R. Singh-Kler, C. Hayes, D.T. Brown, R.W. Taylor, L.A. Bindoff, D.M. Turnbull, The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations, Ann. Neurol. 48 (2000) 188–193.
[10] A.M. Schaefer, R. McFarland, E.L. Blakely, L. He, R.G. Whittaker, R.W. Taylor, P.F. Chinnery, D.M. Turnbull, Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults, Ann. Neurol. 63 (2008) 35–39.
[11] J. Uusimaa, J.S. Moilanen, L. Vainionpaa, P. Tapanainen, P. Lindholm, M. Nuutinen, T. Lopponen, E. Maki-Torkko, H. Rantala, K. Majamaa, Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children, Ann. Neurol. 62 (2007) 278–287.
[12] M. Hirano, E. Ricci, M.R. Koenigsberger, R. Defendini, S.G. Pavlakis, D.C. DeVivo, S. DiMauro, L.P. Rowland, MELAS: an original case and clinical criteria for diagnosis, Neuromuscul. Disord. 2 (1992) 125–135.
[13] S. DiMauro, M. Hirano, MELAS, GeneReviews(R), Seattle (WA), 1993.
[14] V. Nesbitt, R.D. Pitceathly, D.M. Turnbull, R.W. Taylor, M.G. Sweeney, E.E. Mudanohwo, S. Rahman, M.G. Hanna, R. McFarland, The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation–implications for diagnosis and management, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 84 (2013) 936–938.
[15] J. Chin, R. Marotta, M. Chiotis, E.H. Allan, S.J. Collins, Detection rates and phenotypic spectrum of m.3243A>G in the MT-TL1 gene: a molecular diagnostic laboratory perspective, Mitochondrion 17C (2014) 34–41.
[16] M. Mancuso, D. Orsucci, C. Angelini, E. Bertini, V. Carelli, G.P. Comi, A. Donati, C. Minetti, M. Moggio, T. Mongini, S. Servidei, P. Tonin, A. Toscano, G. Uziel, C. Bruno, E.C. Ienco, M. Filosto, C. Lamperti, M. Catteruccia, I. Moroni, O. Musumeci, E. Pegoraro, D. Ronchi, F.M. Santorelli, D. Sauchelli, M. Scarpelli, M. Sciacco, M.L. Valentino, L. Vercelli, M. Zeviani, G. Siciliano, The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? J. Neurol. 261 (2014) 504–510.
[17] P. de Laat, S. Koene, L.P. van den Heuvel, R.J. Rodenburg, M.C. Janssen, J.A. Smeitink, Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A>G mutation, J. Inherit. Metab. Dis. 35 (2012) 1059–1069.
[18] P. Kaufmann, K. Engelstad, Y. Wei, R. Kulikova, M. Oskoui, V. Battista, D.Y. Koenigsberger, J.M. Pascual, M. Sano, M. Hirano, S. DiMauro, D.C. Shungu, X. Mao, D.C. De Vivo, Protean phenotypic features of the A3243G mitochondrial DNA mutation, Arch. Neurol. 66 (2009) 85–91.
[19] Y. Ma, F. Fang, Y. Cao, Y. Yang, L. Zou, Y. Zhang, S. Wang, S. Zhu, Y. Xu, P. Pei, Y. Qi, Clinical features of mitochondrial DNA m.3243A>G mutation in 47 Chinese families, J. Neurol. Sci. 291 (2010) 17–21.
[20] J.H. Chae, H. Hwang, B.C. Lim, H.I. Cheong, Y.S. Hwang, K.J. Kim, Clinical features of A3243G mitochondrial tRNA mutation, Brain and Development 26 (2004) 459–462.
[21] S. Yatsuga, N. Povalko, J. Nishioka, K. Katayama, N. Kakimoto, T. Matsuishi, T. Kakuma, Y. Koga, M.S.G.i.J.T. Matsuoka, MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan, Biochim. Biophys. Acta 1820 (2012) 619–624.
[22] P. Kaufmann, K. Engelstad, Y. Wei, R. Kulikova, M. Oskoui, D.M. Sproule, V. Battista, D.Y. Koenigsberger, J.M. Pascual, S. Shanske, M. Sano, X. Mao, M. Hirano, D.C.

Author's Personal Copy

Shungu, S. Dimauro, D.C. De Vivo, Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype, Neurology 77 (2011) 1965–1971.
[23] E. Ciafaloni, E. Ricci, S. Shanske, C.T. Moraes, G. Silvestri, M. Hirano, S. Simonetti, C. Angelini, M.A. Donati, C. Garcia, et al., MELAS: clinical features, biochemistry, and molecular genetics, Ann. Neurol. 31 (1992) 391–398.
[24] S. Cevoli, F. Pallotti, C. La Morgia, M.L. Valentino, G. Pierangeli, P. Cortelli, A. Baruzzi, P. Montagna, V. Carelli, High frequency of migraine-only patients negative for the 3243A>G tRNALeu mtDNA mutation in two MELAS families, Cephalalgia 30 (2010) 919–927.
[25] G. Di Gennaro, M.G. Buzzi, O. Ciccarelli, F.M. Santorelli, F. Pierelli, D. Fortini, M. D'Onofrio, A. Costa, G. Nappi, C. Casali, Assessing the relative incidence of mitochondrial DNA A3243G in migraine without aura with maternal inheritance, Headache 40 (2000) 568–571.
[26] T. Klopstock, A. May, P. Seibel, E. Papagiannuli, H.C. Diener, H. Reichmann, Mitochondrial DNA in migraine with aura, Neurology 46 (1996) 1735–1738.
[27] M. Mancuso, D. Orsucci, E.C. Ienco, E. Pini, A. Choub, G. Siciliano, Psychiatric involvement in adult patients with mitochondrial disease, Neurol. Sci. 34 (2013) 71–74.
[28] I. Jung, S.H. Park, D.W. Kim, Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome presenting with prolonged visual aura, J. Clin. Neurophysiol. 11 (2015) 104–105.
[29] J.H. Kwon, J.S. Kim, Rhabdomyolysis in a patient with MELAS syndrome, Eur. Neurol. 50 (2003) 123–124.
[30] S. Blum, T. Robertson, S. Klingberg, R.D. Henderson, P. McCombe, Atypical clinical presentations of the A3243G mutation, usually associated with MELAS, Intern. Med. J. 41 (2011) 199–202.
[31] H. Hara, Y. Wakayama, Y. Kouno, H. Yamada, M. Tanaka, T. Ozawa, Acute peripheral neuropathy, rhabdomyolysis, and severe lactic acidosis associated with 3243 A to G mitochondrial DNA mutation, J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 57 (1994) 1545–1546.
[32] M. Lofberg, H. Jankala, A. Paetau, M. Harkonen, H. Somer, Metabolic causes of recurrent rhabdomyolysis, Acta Neurol. Scand. 98 (1998) 268–275.
[33] P.A. Gabow, W.D. Kaehny, S.P. Kelleher, The spectrum of rhabdomyolysis, Medicine (Baltimore) 61 (1982) 141–152.
[34] S. Inoue, M. Nagayama, H. Aoki, K. Tamura, Y. Suzuki, S. Morita, Y. Nakagawa, I. Yamamoto, S. Inokuchi, Continuous venovenous hemodiafiltration for life-threatening mitochondrial myopathy with lactic acidosis and rhabdomyolysis, J. Intensive Care Med. 22 (2007) 240–244.
[35] Y. Hirose, T. Miida, K. Yoshida, H. Kimura, H. Oda, T. Toeda, N. Higuma, High-output heart failure in mitochondrial myopathy: a fulminant form with severe lactic acidosis and rhabdomyolysis, Intern. Med. 32 (1993) 798–801.
[36] G. Inczedy-Farkas, V. Remenyi, A. Gal, Z. Varga, P. Balla, A. Udvardy-Meszaros, B. Bereznai, M.J. Molnar, Psychiatric symptoms of patients with primary mitochondrial DNA disorders, Behav. Brain Funct. 8 (2012) 9.
[37] C. Hoschl, P. Winkler, O. Pec, The state of psychiatry in the Czech Republic, Int. Rev. Psychiatry 24 (2012) 278–285.
[38] E. Malfatti, P. Laforet, C. Jardel, T. Stojkovic, A. Behin, B. Eymard, A. Lombes, A. Benmalek, H.M. Becane, N. Berber, C. Meune, D. Duboc, K. Wahbi, High risk of severe cardiac adverse events in patients with mitochondrial m.3243A>G mutation, Neurology 80 (2013) 100–105.
[39] A. Fayssoil, Heart diseases in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke syndrome, Congest. Heart Fail. 15 (2009) 284–287.
[40] Y. Okajima, Y. Tanabe, M. Takayanagi, H. Aotsuka, A follow up study of myocardial involvement in patients with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS), Heart 80 (1998) 292–295.
[41] A.L. Frederiksen, T.D. Jeppesen, J. Vissing, M. Schwartz, K.O. Kyvik, O. Schmitz, P.L. Poulsen, P.H. Andersen, High prevalence of impaired glucose homeostasis and myopathy in asymptomatic and oligosymptomatic 3243A>G mitochondrial DNA mutation-positive subjects, J. Clin. Endocrinol. Metab. 94 (2009) 2872–2879.
[42] J.A. Maassen, T.H. LM, E. Van Essen, R.J. Heine, G. Nijpels, R.S. Jahangir Tafrechi, A.K. Raap, G.M. Janssen, H.H. Lemkes, Mitochondrial diabetes: molecular mechanisms and clinical presentation, Diabetes 53 (Suppl. 1) (2004) S103–S109.
[43] K. Ohkubo, A. Yamano, M. Nagashima, Y. Mori, K. Anzai, Y. Akehi, R. Nomiyama, T. Asano, A. Urae, J. Ono, Mitochondrial gene mutations in the tRNA(Leu(UUR)) region and diabetes: prevalence and clinical phenotypes in Japan, Clin. Chem. 47 (2001) 1641–1648.
[44] A.W. El-Hattab, L.T. Emrick, J.W. Hsu, S. Chanprasert, F. Jahoor, F. Scaglia, W.J. Craigen, Glucose metabolism derangements in adults with the MELAS m.3243A>G mutation, Mitochondrion 18 (2014) 63–69.
[45] J.M. van den Ouweland, H.H. Lemkes, R.C. Trembath, R. Ross, G. Velho, D. Cohen, P. Froguel, J.A. Maassen, Maternally inherited diabetes and deafness is a distinct subtype of diabetes and associates with a single point mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene, Diabetes 43 (1994) 746–751.
[46] T.M. Tan, C. Caputo, F. Medici, A.L. Pambakian, A. Dornhorst, K. Meeran, G.R. Williams, B. Khoo, MELAS syndrome, diabetes and thyroid disease: the role of mitochondrial oxidative stress, Clin. Endocrinol. 70 (2009) 340–341.
[47] V. Corman, M. Rorive, G. Hennen, K. Windhausen, Clinical case of the month. MELAS syndrome, Rev. Med. Liege 56 (2001) 681–684.
[48] C.Y. Yang, H.C. Lam, H.C. Lee, Y.H. Wei, C.C. Lu, T.M. Han, J.L. Tsai, Y.H. Chuang, J.K. Lee, MELAS syndrome associated with diabetes mellitus and hyperthyroidism: a case report from Taiwan, Clin. Endocrinol. 43 (1995) 235–239.

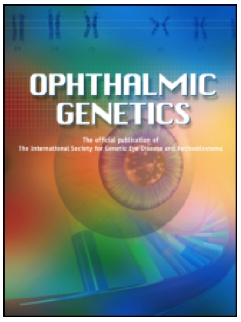
Supplement 8]

***Kolarova, H.**, Liskova, P., Tesarova, M., Vidrova, V.K., Forgac, M., Zamecnik, J., Hansikova, H., Honzik, T.*

Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5.

Ophthalmic Genet 2016 19, 1-5.

[IF: 1,277]



Ophthalmic Genetics

ISSN: 1381-6810 (Print) 1744-5094 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/iopg20

Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5

Hana Kolarova, Petra Liskova, Marketa Tesarova, Vendula Kucerova Vidrova, Martin Forgac, Josef Zamecnik, Hana Hansikova & Tomas Honzik

To cite this article: Hana Kolarova, Petra Liskova, Marketa Tesarova, Vendula Kucerova Vidrova, Martin Forgac, Josef Zamecnik, Hana Hansikova & Tomas Honzik (2016): Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5, Ophthalmic Genetics

To link to this article: http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2015.1092045

Published online: 19 Feb 2016.

Submit your article to this journal

View related articles

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iopg20

Download by: [Knihovna Cerge-Ei] **Date:** 22 February 2016, At: 01:29

OPHTHALMIC GENETICS
http://dx.doi.org/10.3109/13816810.2015.1092045

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

CASE REPORT

Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in *MTND5*

Hana Kolarova[a], Petra Liskova[b,c], Marketa Tesarova[a], Vendula Kucerova Vidrova[a], Martin Forgac[d], Josef Zamecnik[e], Hana Hansikova[a], and Tomas Honzik[a]

[a]Department of Pediatrics and Adolescent Medicine; [b]Laboratory of the Biology and Pathology of the Eye, Institute of Inherited Metabolic Disorders; [c]Department of Ophthalmology; [d]Department of Neurology and Centre of Clinical Neuroscience, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic; [e]Department of Pathology and Molecular Medicine, Second Faculty of Medicine, Charles University in Prague and University Hospital Motol in Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Background: Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and mitochondrial encephalopathy, myopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) syndromes are mitochondrially inherited disorders characterized by acute visual failure and variable multiorgan system presentation, respectively.

Materials and methods: A 12-year-old girl with otherwise unremarkable medical history presented with abrupt, painless loss of vision. Over the next few months, she developed moderate sensorineural hearing loss, vertigo, migraines, anhedonia and thyroiditis. Ocular examination confirmed bilateral optic nerve atrophy. Metabolic workup documented elevated cerebrospinal fluid lactate. Initial genetic analyses excluded the three most common LHON mutations. Subsequently, Sanger sequencing of the entire mitochondrial DNA (mtDNA) genome was performed.

Results: Whole mtDNA sequencing revealed a pathogenic heteroplasmic mutation m.13046T>C in *MTND5* encoding the ND5 subunit of complex I. This particular variant has previously been described in a single case report of MELAS/Leigh syndrome (subacute necrotizing encephalopathy). Based on the constellation of clinical symptoms in our patient, we diagnose the condition as LHON/MELAS overlap syndrome.

Conclusions: We describe a unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome resulting from a m.13046T>C mutation in a 12-year-old girl. In patients with sudden vision loss in which three of the most prevalent LHON mitochondrial mutations have been ruled out, molecular genetic examination should be extended to other mtDNA-encoded subunits of *MTND5* complex I. Furthermore, atypical clinical presentations must be considered, even in well-described phenotypes.

ARTICLE HISTORY
Received 11 April 2015
Revised 25 August 2015
Accepted 5 September 2015

KEYWORDS
LHON; loss of vision; MELAS; mitochondrial DNA; ND5; overlap syndrome

Downloaded by [Knihovna Cerge-Ei] at 01:29 22 February 2016

Introduction

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and mitochondrial encephalopathy, myopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) syndromes are mitochondrially inherited diseases characterized by acute vision loss and variable multiorgan system presentation, respectively. Occasionally, vision loss in LHON may have associated features, such as pre-excitation syndromes, perceptual hearing loss or peripheral neuropathy, or may involve the central nervous system with basal ganglia degeneration, a condition previously termed LHON plus.[1] However, only a limited number of such cases have been reported. Interestingly, these are geographically restricted and result from the three common ND1, ND4 or ND6 subunit mutations.[2,3] MELAS usually presents with variable findings, ranging from oligosymptomatic to full phenotypic expression as described by its acronym. The majority of patients present with elevated cerebrospinal fluid (CSF) lactate, a feature that is not found in LHON. In oligosymptomatic MELAS, perceptual hearing loss, diabetes, migraines, psychiatric disturbances and thyroiditis are findings that are frequently observed (in approximately 75, 50, 25, 15 and 9% of patients, respectively). Conversely, atrophy of the optic nerve resulting in vision loss is present in less than 5% of cases and progresses slowly over years to decades.[4]

In both disease processes, more than 95% of cases are associated with three common mutations: m.11778G>A/*MTND4*, m.3460G>A/*MTND1*, m.14484T>C/*MTND6* and m.3243A>G/*MTTL1*, m.3271T>C/*MTTL1*, m.13513G>A/*MTND5*, in LHON and MELAS, respectively. LHON/MELAS or LHON/MELAS/Leigh overlap syndromes are rare conditions that are often associated with uncommon mitochondrial DNA (mtDNA) mutations.[5] Here, we describe a unique phenotype of LHON/oligosymptomatic MELAS overlap syndrome caused by a rare m.13046T>C mutation in the ND5 subunit of complex I.

Case report

A 12-year-old girl with an uneventful perinatal history presented with an abrupt, painless loss of vision in both eyes.

CONTACT Tomas Honzik, MD, PhD tomas.honzik@vfn.cz Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic.

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/iopg.

© 2016 Taylor & Francis

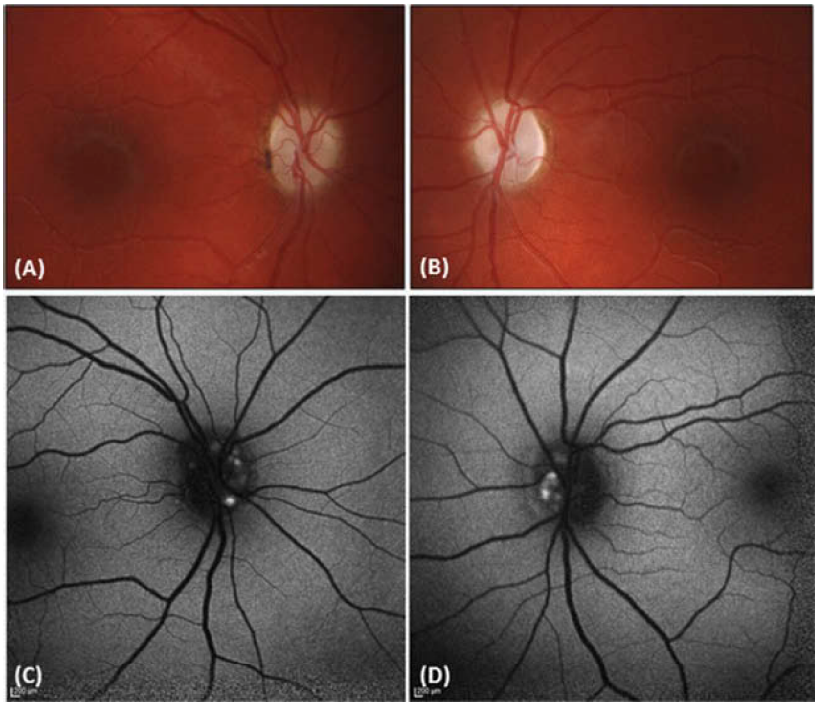


Figure 1. Fundus photography and autofluorescence imaging. Pale optic discs in the right (A) and in the left (B) eye. Optic nerve drusen presenting as focal areas of autofluorescent superficial deposits in the right (C) and in the left (D) eye.

Downloaded by [Knihovna Cerge-Ei] at 01:29 22 February 2016

One month later, she developed hearing loss, vertigo and anhedonia. Since then, she has complained of migraine attacks that did not respond to simple analgesics. A year after developing visual symptoms, she presented with struma due to incipient thyroiditis with a negative endocrine workup but confirmed by ultrasound scanning.

One year prior to the onset of visual loss, the patient underwent an ophthalmic examination. Her best corrected visual acuity (BCVA) was 1.0 in both eyes. Two months after the presentation, BCVA was reduced to 0.2 in the right eye and 0.03 in the left eye (per outside clinic records). One and a half years after the disease manifestation, the case was referred to our tertiary care hospital for evaluation, and BCVA was 0.125 in the right eye and 0.02 in the left eye. Both optic nerves appeared pale (Figure 1A, B). As an additional finding, fundus autofluorescence images showed bilaterally hyperfluorescent optic nerve deposits (Figure 1C, D). B-scan ultrasonography confirmed hyperechoic regions over the optic nerve head consistent with a diagnosis of superficial drusen. Standard automated perimetry (M-700, Medmont International, Vermont, Australia) revealed severe bilateral visual field loss (Figure 2A, B). Peripapillary retinal nerve fiber layer (RNFL) measurements were acquired at a diameter of 3.54 mm, targeted around the optic nerve using a spectral-domain device (Spectralis, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany). RNFL loss confirmed the presence of bilateral optic neuropathy (Figure 2C, D). Neither ptosis nor ophthalmoplegia were observed. Visual evoked potentials showed overall reduced amplitudes with prolonged P100 wave latencies bilaterally, confirming abnormal neural conduction along the visual pathways pronounced primarily in the retrobulbar portion of the optic nerve. Hearing loss was classified as moderate sensorineural (30 dB loss in the right ear and 20 dB in the left ear). Electromyography, brain magnetic resonance imaging and cardiovascular examination did not reveal any significant pathology.

Initial genetic analyses ruled out the most common LHON mutations (m.11778G>A, m.3460G>A and m.14484T>C) in mtDNA. Extensive metabolic workup documented only elevated CSF lactate of 4.25 mmol/l (normal <2.1). Muscle biopsy did not show myopathic or neurogenic changes. Enzyme histochemistry revealed focal subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase reaction product in up to 5% of muscle fibers (Figure 3A). Cytochrome *c* oxidase-negative fibers were not observed; however, the reaction was weakened focally (Figure 3B). These distinctive histological findings indicate incipient mitochondrial myopathy in our patient. Spectrophotometric analyses of specific activities of respiratory chain complexes were conducted in isolated mitochondria from fresh muscle biopsies. There was a 50% reduction in the activity of complex I of the respiratory chain, while activities of complexes II, III and IV were within the control range. Furthermore, measurements of mitochondrial energy-generating capacity in fresh muscle postnuclear supernatant with various radiolabelled substrates indicated oxidative phosphorylation deficiency.

Mitochondrial DNA sequencing revealed a pathogenic heteroplasmic mutation m.13046T>C in *MTND5* that encodes the ND5 subunit of complex I. Quantification of mutational load in examined tissue showed the following: urine sediment 71%, muscle 70%, hair follicles 44%, fibroblasts 40%, buccal smear 34% and blood 27%. The mutation was not detected in blood, urine sediment, buccal smear or hair follicles from the patient's asymptomatic mother and two younger brothers.

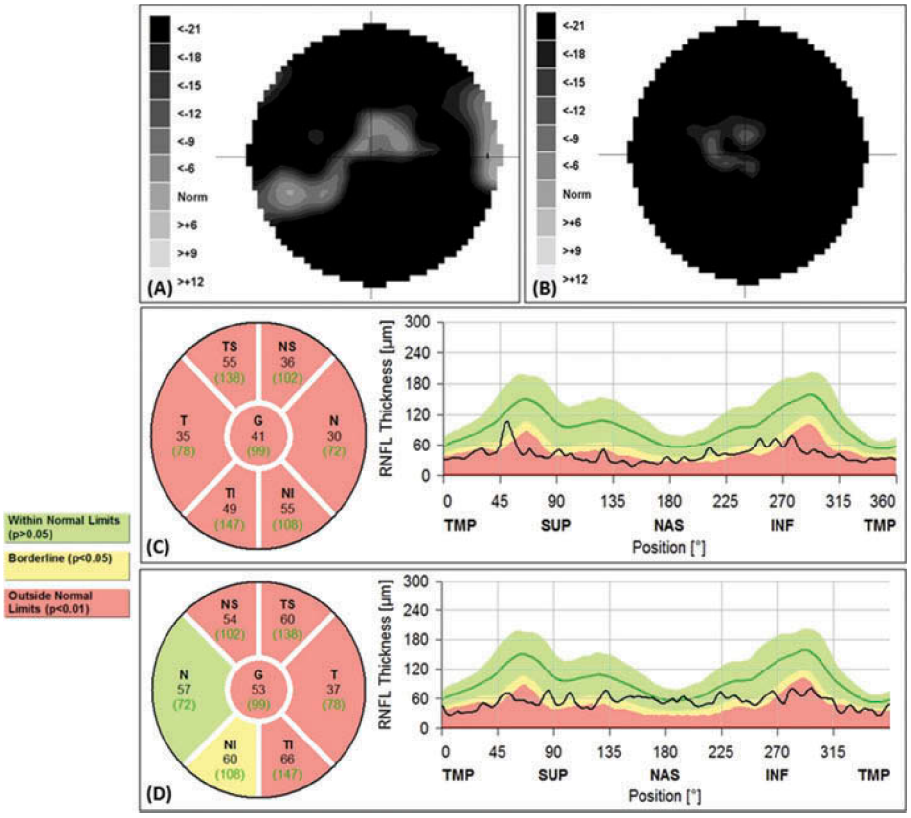


Figure 2. Automated perimetry and retinal nerve fibre layer thickness measurements obtained at the age of 13.5 years. Visual field loss within the central 22°; centrocaecal island extending to the nasal inferior region in the right eye (A) and small central island remains in the left eye (B). Reduction in retinal nerve fibre layer thickness and loss of striation pattern in the right eye (C). Relative preservation of the nasal quadrant in the left eye (D).

These findings may result from extremely low mutation load in analyzed tissues and/or the limited presence of the mutation in the mother's oocytes.

Discussion

We present a unique phenotype of LHON/MELAS overlap syndrome caused by a rare mtDNA mutation m.13046T>C, previously described in a single case report. The clinical presentation of sudden vision loss and characteristic changes on ophthalmic examination are fully compatible with the diagnosis of LHON; furthermore, the patient's elevated CSF lactate, perceptual hearing loss, migraines and thyroiditis are findings frequently associated with oligosymptomatic MELAS. To the best of our knowledge optic nerve head drusen detected in our patient have not been reported in association with LHON and/or MELAS patients. Even though we cannot exclude drusen as an incidental finding, their possible association with LHON warrants further investigation.

The disease-causing mutation m.13046T>C in the *MTND5* encoding the ND5 subunit of complex I was previously detected in a 13-year-old girl with a 2-way overlap syndrome MELAS/Leigh who presented with abnormal gait, stroke-like episodes and characteristic brain MRI imaging.[6] For mitochondrial disorders, it is not unusual for the same mutation

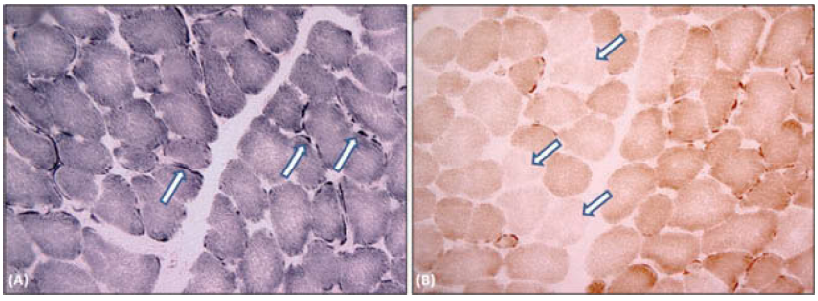


Figure 3. In muscle biopsy, focal subsarcolemmal accumulation of succinate dehydrogenase reaction product (exemplified by arrows) was observed in 5% of muscle fibers (A, succinate dehydrogenase histochemistry, original magnification ×200). Cytochrome *c* oxidase-negative fibers were not observed, nevertheless, the reaction was weakened focally (B, cytochrome *c* oxidase histochemistry, original magnification ×200, exemplified by arrows).

Downloaded by [Knihovna Cerge-Ei] at 01:29 22 February 2016

to result in different phenotypes. While several factors are suspected to be responsible for mitochondrial disease manifestations, mutational load remains a hotly debated issue. In our patient, we observed wide-ranging mutational load in examined tissues, a finding that may suggest less compromised mitochondrial function without the involvement of the central nervous system. This hypothesis is supported by the work of Blok and colleagues and Crimi and colleagues who observed similarly high levels of heteroplasmy in examined tissues of patients with Leigh or MELAS/Leigh syndrome, respectively. Furthermore, these studies reported mutations in close proximity to the pathogenetic variant identified in our patient.[7,8]

The amino acid substitution p.Met237Thr caused by the mutation m.13046T>C is located in the loop of the highly conserved domain of subunit ND5, the last and likely rate-limiting component of complex I.[9] In the last two decades, an increasing number of mutations have been identified in the *MTND5* related to mitochondrial disorders. Moreover, it has been previously shown that *MTND5* mutations become relatively prevalent (27%) when the common mutations of mitochondrial disorders are excluded.[7] The most frequent mutation in the *MTND5* is m.13513G>A, which is usually associated with MELAS or MELAS overlap phenotypes including LHON/MELAS.[10,11] The mutations m.3243A>G and m.3271T>C both encode mitochondrial tRNA-leu. Together, these three mutations are responsible for more than 95% of MELAS cases. Three common mutations in the ND1, ND4 and ND6 subunit account for approximately 95% cases of LHON, although there are seven other mutations in the genes encoding mitochondrial complex I that are responsible for the development of this disorder.[12] Nevertheless, only rare cases of isolated LHON have been associated with *MTND5* mutations. Furthermore, it has been suggested that, with *MTND5* base changes, an extended phenotype can be expected rather than a phenotype limited to visual dysfunction.[13]

Vascular dysfunction appears to play an important role in the ethiopathogenesis of mitochondrial disorders. Microangiopathic changes accompanied by dramatic collections of abnormal mitochondria in both endothelial and vascular smooth muscle cells were observed in cases of LHON and MELAS; similar vascular changes also characterize Leigh syndrome.[13–15] Vascular cell loss and blood-brain barrier breakdown could result in multiple ischemic-like lesions occurring in MELAS patients and vasculo-necrotic damage affecting basal ganglia and brainstem in Leigh syndrome. In LHON patients, it was observed that the prelaminar non-myelinated portions of the optic nerve, that are specifically damaged in LHON, are more energy-dependent than the myelinated portions characterized by more efficient saltatory conduction.[13] Moreover, the optic nerve preceding the lamina cribrosa is characterized by an altered blood-brain barrier with non-specific vesicular permeability and thus may be more susceptible to toxic damage.[16] Thus, the pathogenetic sequences that lead to LHON, MELAS and Leigh syndromes may share a common microangiopathic mechanism with varying degrees of central nervous system involvement.[13] Within this spectrum, LHON would be considered rather a mild disorder, as it is limited to the optic nerve. However, we cannot exclude future progression to Leigh syndrome in our patient, and thus, regular magnetic resonance imaging is recommended.

Here, we have described a unique phenotype, overlap syndrome of LHON and oligosymptomatic MELAS, associated with a rare m.13046T>C mutation in the ND5 subunit of complex I. In cases of vision loss suspected to be due to a mitochondrial disorder, after ruling out the three most common pathogenic changes, mutations in other subunits of complex I must be considered.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Funding

This work was supported by grants IGA NT 14156/3, IGA NT 13114/4, GAUK 38515/2015 and by institutional research support by Charles University in Prague (PRVOUK P24/LF1/3, RVO-VFN 64165, SVV UK 260148/2015).

References

1. Fraser JA, Biousse V, Newman NJ. The neuro-ophthalmology of mitochondrial disease. Surv Ophthamol 2010;55:299–334.
2. Nikoskelainen EK, Martilla RJ, Huoponen K, et al. Leber's plus: neurological abnormalities in patients with Leber's hereditary optic neuropathy. J Neurol 1995;59:160–164.
3. Wallace DC A new manifestation of Leber's disease and a new explanation for the agency responsible for this unusual pattern of inheritance. Brain 1970;93:121–132.
4. Mancuso M, Orsucci D, Angelini C, et al. The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? J Neurol 2014;261:504–510.
5. Blakely EL, de Silva R, King A, et al. LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial *MTND1* gene mutation. Eur J Hum Genet 2005;13:623–627.
6. Zhao D, Hong D, Zhang W, et al. Mutations in the mitochondrially encoded complex I enzyme as the second cause in the cohort of Chinese patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes. J Hum Genet 2011;56:759–764.
7. Blok MJ, Spruijt L, de Coo IFM, et al. Mutations in the ND5 subunit of complex I of the mitochondrial DNA are a frequent cause of oxidative phosphorylation disease. J Med Genet 2007;44:1–5.
8. Crimi M, Galbiati S, Moroni I, et al. A missense mutation in the mitochondrial ND5 gene associated with a Leigh-MELAS overlap syndrome. Neurology 2000;60:1857–1861.
9. Bai Y, Shakeley RM, Attardi G. Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. Mol Cell Biol 2000;20:805–815.
10. Shanske S, Eunson L, Patterson V, et al. The G13513A mutation in the ND5 gene of the mitochondrial DNA is a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases. Arch Neurol 2008;65:368–372.
11. Pulkes T, Eunson L, Patterson V, et al. The mitochondrial DNA G13513A transition in ND5 is associated with a LHON/MELAS overlap syndrome and may be a frequent cause of MELAS. Ann Neurol 1999;46:916–919.
12. Mayorov V, Biousse V, Newman J, et al. The role of the ND5 gene in LHON: characterization of a new, heteroplasmic LHON mutation. Ann Neurol 2005:58:807–811.

Downloaded by [Knihovna Cerge-Ei] at 01:29 22 February 2016

13. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. Prog Retin Eye Res 2004;23:53–89.
14. Hasegawa H, Matsuoka T, Goro Y, et al. Strongly succinate dehydrogenase-reactive blood vessels in muscles from patients with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. Ann Neurol 1991;29:601–605.
15. Cavanagh JB, Harding BN. Pathogenetic factors underlying the lesions in Leigh's disease. Tissue responses to cellular energy deprivation and their clinico-pathological consequence. Brain 1994;117:1357–1376.
16. Hofman P, Hoyng P, vanderWerf F, et al. Lack of blood-brain barrier properties in microvessels of the prelaminar optic nerve head. Invest Ophtalmol 2011;42:895–901.

Downloaded by [Knihovna Cerge-Ei] at 01:29 22 February 2016

Supplement 9]

Liskova, P., Tesarova, M., Dudakova, L., Svecova, S., ***Kolarova, H.****, Honzik, T., Seto, S., Votruba. M.*

OPA1 analysis in a series of 44 probands with optic atrophy.

Acta Ophtalmol 2016 95(4):363-369.

[IF: 3,157]

Acta Ophthalmologica

OPA1 analysis in an international series of probands with bilateral optic atrophy

Petra Liskova,[1,2] Marketa Tesarova,[3] Lubica Dudakova,[1] Stepanka Svecova,[3] Hana Kolarova,[3] Tomas Honzik,[3] Sharon Seto[4,5] and Marcela Votruba[4,5]

[1]Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic
[2]Department of Ophthalmology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic
[3]Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic
[4]Cardiff Eye Unit, University Hospital of Wales, Cardiff, UK
[5]School of Optometry & Vision Sciences, Cardiff University, Cardiff, UK

ABSTRACT.

Purpose: **To determine the molecular genetic cause in previously unreported probands with optic atrophy from the United Kingdom, Czech Republic and Canada.**

Methods: ***OPA1*** **coding regions and flanking intronic sequences were screened by direct sequencing in 82 probands referred with a diagnosis of bilateral optic atrophy. Detected rare variants were assessed for pathogenicity by *in silico* analysis. Segregation of the identified variants was performed in available first degree relatives.**

Results: **A total of 29 heterozygous mutations evaluated as pathogenic were identified in 42 probands, of these seven were novel. In two probands, only variants of unknown significance were found. 76% of pathogenic mutations observed in 30 (71%) of 42 probands were evaluated to lead to unstable transcripts resulting in haploinsufficiency. Three probands with the following disease-causing mutations c.1230+1G>A, c.1367G>A and c.2965dup were documented to suffer from hearing loss and/or neurological impairment.**

Conclusions: ***OPA1*** **gene screening in patients with bilateral optic atrophy is an important part of clinical evaluation as it may establish correct clinical diagnosis. Our study expands the spectrum of *OPA1* mutations causing dominant optic atrophy and supports the fact that haploinsufficiency is the most common disease mechanism.**

Key words: DOA *plus* syndrome – dominant optic atrophy – haploinsufficiency – novel mutations – *OPA1*

Acta Ophthalmol.

© 2016 The Authors. Acta Ophthalmologica published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation and European Association for Vision & Eye Research.
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

doi: 10.1111/aos.13285

Introduction

Autosomal dominant optic atrophy (DOA, OMIM 165500) is the most common hereditary optic neuropathy with an estimated prevalence of 1:12 000–1:50 000 (Lyle 1990; Kjer et al. 1996). The disease is genetically heterogeneous, with five mapped loci (Votruba et al. 1997; Kerrison et al. 1999; Anikster et al. 2001; Barbet et al. 2005; Carelli et al. 2011). To date however, only two genes have been identified as disease causing: optic atrophy gene 1 (*OPA1*; MIM 165500) (Alexander et al. 2000; Delettre et al. 2000) and optic atrophy gene 3 (*OPA3*; MIM 606580) (Anikster et al. 2001; Reynier et al. 2004). *OPA1* is the most frequently mutated gene causing DOA accounting for up to 60% of cases with inherited optic atrophies (Yu-Wai-Man et al. 2009).

Autosomal dominant optic atrophy (DOA) shows highly variable expression, onset and progression. In most patients, the disease manifests by the end of the first decade of life. Typically, loss of central vision, optic nerve pallor, a centrocaecal scotoma and colour vision deficit are observed (Votruba et al. 1998; Rönnbäck et al. 2015). In some individuals, DOA *plus* phenotype is found, characterized by variable presence of sensorineural hearing loss, ataxia, axonal sensory-motor polyneuropathy, multiple sclerosis-like phenotype, chronic progressive external ophthalmoplegia and mitochondrial myopathy (Amati-Bonneau et al. 2009; Yu-Wai-Man et al. 2010; Liskova et al. 2013). Most recently association of *OPA1* mutations with a multisystem disorder characterized by

age-related parkinsonian features as well as cognitive deterioration has been described (Carelli et al. 2015).

The OPA1 protein is a mitochondrially targeted dynamin-related GTPase located on the inner mitochondrial membrane functioning mainly in mitochondrial fusion and regulation of apoptosis (Cho et al. 2010). Initial studies suggested that OPA1 dysfunction leads to primary retinal ganglion cell degeneration (Olichon et al. 2007); however, recent evidence proposes that more diverse mechanisms are implicated in the disease pathogenesis (Bertholet et al. 2013).

The aim of our study was to explore the involvement of *OPA1* mutations in a large cohort of probands with bilateral optic atrophy.

Material and Methods

Patients

In this study, we have included samples of 81 probands of white British, Canadian and Czech origin and one proband of Czech Roma origin referred with the diagnosis of bilateral optic atrophy to the All Wales Genetic Testing Service; University Hospital of Wales and General University Hospital in Prague for laboratory investigation. The study followed the tenets of the Declaration of Helsinki and was authorized by local Ethical boards. All investigated individuals signed informed consent.

Clinical referral notes of the patients indicated bilateral impairment of best corrected visual acuity, pallor of the optic nerve head, evidence of colour vision deficit and no evidence of other factors causing compressive or optic neuropathy. In some probands but not all clinical data included also family history for optic atrophy and results of neurological and audiometry examinations.

Molecular genetic analysis

Prior to the start of the study, participating probands were tested negative for the three most prevalent mitochondrial mutations associated with Leber hereditary optic neuropathy (Yu-Wai-Man et al. 2011). Positive family history of the disease was not a prerequisite for the initiation of *OPA1* molecular genetic testing.

Genomic DNA was extracted from venous blood samples using conventional protocols. PCR amplification and bidirectional Sanger sequencing of the *OPA1* coding regions and intron–exon boundaries were performed in probands as previously described (Thiselton et al. 2002). Primer sequences are listed in Table S1. DNA samples from available first degree relatives were also collected and used for targeted genetic testing of variants considered as potentially pathogenic.

Sequence variants were described as per the Human Genome Variation Society recommendations (den Dunnen & Antonarakis 2000), and with reference to NG_011605.1 and *OPA1* transcript variant 8 (NCBI Reference Sequence: NM_130837.2) containing two additional exons 4b and 5b compared to transcript variant 1 (NM_015560.2) maintaining however the same reading frame and encoding a protein of 1015 amino acids.

Interpretation of mutation pathogenicity

Frequency of the changes detected in this study was searched in the following population databases: The Exome Aggregation Consortium (ExAC) (http://exac.braoadinstitute.org) showing exome sequencing data from more than 60 000 unrelated individuals and The Exome Variant Server (EVS, NHLBI Exome Sequencing Project; http://evs.gs.washington.edu/EVS/), which includes data from more than 6000 individuals (both accessed 7 May 2016). Only rare variants (i.e. minor allele frequency ≤ 0.001) were further evaluated for potential pathogenicity. Identified sequence changes were further cross-referenced with published literature and the e*OPA1* mutational database (http://mitodyn.org, accessed December 2015).

As it has been convincingly documented that reduction in OPA1 protein levels is a disease mechanism in DOA (Marchbank et al. 2002; Schimpf et al. 2008; Fuhrmann et al. 2009) variants predicted to lead to an absence of the gene product due to the mRNA nonsense-mediated decay mechanism (e.g. nonsense or frameshifting mutations located 50–55 bp upstream from the last intron–exon junction) were considered as pathogenic.

The pathogenicity of missense variants was predicted using various algorithms; Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) (Kumar et al. 2009), Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) (Adzhubei et al. 2010), MutPred (Li et al. 2009), Mutation Taster (Schwarz et al. 2010), SNPs&GO (Calabrese et al. 2009), PhD-SNP (Capriotti et al. 2006), PROVEAN (Choi et al. 2012) and Panther (Capriotti et al. 2006). Novel *OPA1* missense variants with no entry in ExAC and EVS and predicted harmful by at least three tools were regarded as pathogenic. Heterozygous missense variants previously observed in DOA patients and not present in population databases were also considered pathogenic, regardless of their scoring by *in silico* algorithms.

As cDNA was not available to experimentally evaluate whether canonical (± 1 or 2), non-canonical splice variants and coding variants close to intron–exon boundaries (i.e. +1, +2 or −1, −2) affect pre-mRNA splicing, the wild-type and mutated sequences were analysed by splice site prediction tools Human Splicing Finder (Desmet et al. 2009), NNSPLICE (Reese et al. 1997), MaxEntScan (Yeo & Burge 2004) and NetGene2 (Brunak et al. 1991). Mutations leading to the disruption of splice site predicted by at least three of the four tools used were considered pathogenic. Conservation analysis of affected amino acid residues across 16 species was performed using T-coffee (Di Tommaso et al. 2011).

Sequence variants not segregating with the disease phenotype, that is not present in all affected members of a given family were considered benign. As penetrance of DOA maybe as low as 43% (Toomes et al. 2001), the presence of a mutation in clinically unaffected family members was not considered to be excluding its pathogenic nature.

Results

Summary of the study cohort demographics and rare variants identified is provided in Table 1. In total, 32 rare sequence changes in a heterozygous state were detected in *OPA1* coding region and intron–exon boundaries in 44 probands, of 82 tested. Pathogenicity scores of missense variants and effect predictions of variants potentially affecting splicing are provided in Tables S2, S3, respectively. All novel pathogenic variants were submitted to the *OPA1* locus specific database (http://opa1.mitodyn.org/) (Ferre et al. 2015).

Table 1. Disease-causing and rare *OPA1* variants of unknown clinical pathogenicity found in British, Czech and Canadian white probands, and one Roma proband with optic atrophy. Allele count in the ExAC database is shown as number of alleles found for with a given variant of the total number of alleles tested. In compliance with the HGVS nomenclature guidelines, no brackets in description of mutation at the protein level indicate that the effect on mRNA has been experimentally verified.

Proband no/origin	Family history	Mutation description		mRNA transcript alteration	Position at chromosome 3	ExAC	Mutation classification	Reference
		DNA	Protein domain (missense mutations)					
1/B	Y	c.678+1G>T	p.?	Splicing	3:193336726	N	Pathogenic	Novel
2/B	Y	c.800_801del	p.(Lys267Argfs*4)	Frameshift	3:193349411	1/120600	Pathogenic	(Toomes et al. 2001)
3/CZ	N	c.943C>T	p.(Leu315Phe) Downstream from coiled coil 1	Missense	3:193353306	N	Unknown significance	Novel
4/B	N	c.949-1G>C	p.?	Splicing	3:193354983	N	Pathogenic	Novel
5/B	N	c.949-2A>G	p.?	Splicing	3:193354982	N	Pathogenic	Novel
6/B	N	c.980T>C	p.(Leu327Pro) Downstream from coiled coil 1	Missense	3:193355015	N	Pathogenic	(Baris et al. 2003; Almind et al. 2012)
		c.1805C>A	p.(Ala602Glu) Dynamin, GTPase domain	Missense	3:193364904	N	Pathogenic	Novel
7/CZ	Y	c.1034G>A	p.Arg345Gln	Missense	3:193355069	N	Pathogenic	(Lunkes et al. 1995; Alexander et al. 2000; Gallus et al. 2012; Russo et al. 2013)
8/CZ	Y		Dynamin, GTPase domain					
9/B	Y							
10/B	Y	c.1035+5G>A	p.Lys317_Arg345del	Splicing	3:193355075	1/121286	Pathogenic	(Toomes et al. 2001)
11/B	N							
12/B	NA	c.1148A>G	p.Val346_Phe383del	Splicing	3:193355853	N	Pathogenic	(Baris et al. 2003)
13/CZr	N	c.1230+1G>A	p.Val384_Asp410del	Splicing	3:193360635	N	Pathogenic	(Schimpf et al. 2008)
14/C	Y	c.1305+5G>C	p.Leu411_Glu435del	Splicing	3:193360843	N	Pathogenic	(Schimpf et al. 2008)
		c.2355G>C**	p.(Leu785Phe) Middle domain	Missense	3:193376699	N	Unknown significance	Novel
15/B	N	c.1367G>A	p.(Gly456Asp) Dynamin, GTPase domain	Missense	3:193361223	N	Pathogenic	(Kim et al. 2005; Ke et al. 2006; Leruez et al. 2013)
16/B	N	c.1377_1377+4del	p.?	Splicing	3:193361233	N	Pathogenic	(Puomila et al. 2005)
17/B	Y	c.1673C>A	p.(Thr558Lys)	Missense	3:193363406	N	Pathogenic	(Toomes et al. 2001; Thiselton et al. 2002)
18/B	Y		Dynamin, GTPase domain					
19/B	Y							
20/B	N							
21/B	Y	c.1681+1G>T	p.?	Splicing	3:193363415	N	Pathogenic	(Toomes et al. 2001)
22/B	NA							
23/B	Y							
24/B	Y							
25/B	N							
26/B	Y	c.1834C>T	p.(Arg612*)	Nonsense	3:193364933	1/114298	Pathogenic	(Toomes et al. 2001)
27/B	N	c.1835G>C	p.(Arg612Pro) Dynamin, GTPase domain	Missense	3:193364934	N	Pathogenic	(Kim et al. 2005)
28/B	Y	c.1935+3A>G	p.?	Splicing	3:193365926	1/120536	Unknown significance	(Toomes et al. 2001)
29/B	Y	c.1943T>C	p.(Leu648Pro)	Missense	3:193366591	N	Pathogenic	(Ferre et al. 2009; Manners et al. 2015)
30/B	N		Middle domain					
31/B	NA	c.1945_1948del	p.(Phe649Lysfs*14)	Frameshift	3:193366593	N	Pathogenic	(Toomes et al. 2001)
32/B	Y	c.1989del	p.(Ser664Alafs*24)	Frameshift	3:193366637	N	Pathogenic	Novel

Table 1. (Continued)

Proband no/origin	Family history	Mutation description		mRNA transcript alteration	Position at chromosome 3	ExAC	Mutation classification	Reference
		DNA	Protein domain (missense mutations)					
33/B	Y	c.2102del	p.(Ser701*)	Nonsense	3:193372740	N	Pathogenic	Novel
		c.2873_2876del	p.Val958Glyfs*3	Frameshift	3:193384959	N	Pathogenic	(Delettre et al. 2000, 2001; Murton et al. 2001; Pesch et al. 2001; Toomes et al. 2001; Baris et al. 2003; Schimpf et al. 2008)
34/B	N	c.2296C>T	p.(Arg766*)	Nonsense	3:193374986	N	Pathogenic	(Delettre et al. 2001)
35/B	Y	c.2734C>T	p.(Arg912*)	Nonsense	3:193382741	N	Pathogenic	(Ferre et al. 2009)
36/B	NA	c.2778+1G>A	p.?	Splicing	3:193382786	N	Pathogenic	(Toomes et al. 2001)
37/C	NA	c.2779-1G>A	p.?	Splicing	3:193384084	N	Pathogenic	(Ferre et al. 2009)
38/B	N	c.2858_2865dup	p.(Thr956Leufs*9)	Frameshift	3:193384164	N	Pathogenic	Novel
39/CZ	N	c.2873_2876del	p.Val958Glyfs*3	Frameshift	3:193384959	N	Pathogenic	(Delettre et al. 2000, 2001; Murton et al. 2001; Pesch et al. 2001; Toomes et al. 2001; Baris et al. 2003; Schimpf et al. 2008)
40/B	Y							
41/B	Y							
42/B	Y							
43/B	N							
44/CZ	Y	c.2965dup	p.(Gln989Profs*10)	Frameshift	3:193385051	N	Pathogenic	Novel

B = British, C = Canadian, CZ = Czech, CZr = Czech Roma, Y = yes, N = none, NA = not available data, ExAC = Exome Aggregation Consortium.
NM_130837.2 was used as the reference sequence. Chromosomal position corresponds to the human genome build GRCh37/hg19 and in case of a deletion or duplication of multiple nucleotides the position of the first nucleotide is indicated.

Altogether, 29 mutations observed in 42 probands were evaluated as pathogenic and three sequence variants were classified as being of unknown significance, of these one was present in a proband carrying a different *OPA1* disease-causing mutation. The predicted and/or in previous studies already functionally verified effect of disease-causing variants was missense ($n = 7$), splicing ($n = 11$), nonsense ($n = 4$) and frameshifting ($n = 7$) (Table 1).

Eight mutations identified are in bases of canonical dinucleotides at the splice-acceptor or splice-donor site. In addition, three other mutations found in the current study c.1035+5G>A, c.1305+5G>C and c.1148A>G were previously experimentally shown to cause a splicing defect (Baris et al. 2003; Schimpf et al. 2008). *In silico* analysis supported deleterious effect of nine mutations on pre-mRNA splicing (Table S3).

Six mutations were found in more than one proband, c.1034G>A in two Czech and one UK proband, c.1035+5G>A in two UK probands, c.1673C>A in four UK probands, c.1681+1G>T in five UK probands, c.1943T>C in two UK probands, c.2873_2876del in one Czech and four UK probands.

In three patients, two rare variants were detected; p.(Leu327Pro) and p.(Ala602Glu) in proband 6; p.Leu411_Glu435del and p.(Leu785Phe) in proband 14; p.(Ser701*) and p.Val958Glyfs*3 in proband 33. Unfortunately, in families of probands 6 and 33, we were not able to determine whether these mutations were present on the same allele or in a compound heterozygous state due to the unavailability of DNA samples from other family members. In family of proband 14, targeted mutational screening of similarly affected proband's mother confirmed their *cis* position. *In silico* analysis (Table S2) suggested that p.(Leu785Phe) is of unknown significance therefore less likely to be disease causing.

None of the identified 32 rare sequence *OPA1* variants was found in the EVS database. Three pathogenic mutations and one variant of unknown significance had an entry in the ExAC database (Table 1).

Altogether, 16 probands of 39 did not report a family history of visual loss, and in five probands this

information was not available. Mutational screening and clinical evaluation to assess possible *de novo* occurrence and penetrance could be performed (due to sample unavailability) only in two-first degree relatives from pedigrees of probands 8 and 14. Both had signs of bilateral optic atrophy and carried c.1034G>A and c.1305+5G>C mutations, respectively.

DOA *plus* phenotype was documented in three individuals. Proband 13 harbouring c.1230+1G>A noticed gradual visual loss since childhood and hearing loss since 23 years of age, which was confirmed by brainstem auditory evoked potential examination. Analysis of cerebrospinal fluid at the age of 22 years revealed four positive oligoclonal bands of immunoglobulin G and slightly decreased protein level which is consistent with multiple sclerosis-like phenotype. The patient denied permission to undergo brain MRI. CT scan of the brain revealed only the presence of bilateral optic atrophy. Proband 15 harbouring c.1367G>A had hearing loss, peripheral neuropathy and proband 44 with c.2965dup had hearing loss and peripheral sensitive axonal neuropathy. Interestingly, she reported that her mother also suffered from severe neurological impairment and that she was diagnosed with multiple sclerosis. Unfortunately, her mother could not be examined as she had died of cancer. In addition, proband 3 found to carry c.943C>T (classified as variant of unknown significance) was reportedly diagnosed elsewhere with peripheral neuropathy.

Discussion

Herein, we report on rare *OPA1* sequence variants identified in a large cohort of international patients (white British, Canadian, Czech and one proband of Czech Roma origin) with bilateral optic atrophy. Ten novel sequence changes were detected, of these seven were considered pathogenic and three as variants of unknown significance. Two probands carried two different pathogenic mutations. Similarly, to other studies aiming at the identification of the underlying cause of bilateral optic atrophy (Toomes et al. 2001; Ferre et al. 2009; Chen et al. 2014), all probands with no paternal family history were prescreened for common mitochondrial mutations associated with Leber hereditary optic neuropathy prior to *OPA1* screening.

The great majority 22 (76%) of the detected 29 pathogenic mutations observed in 30 (71%) of 42 probands (including one individual with two frameshifting mutations) were predicted to lead to unstable transcripts likely to be degraded by mRNA nonsense-mediated decay cell mechanism (Pesch et al. 2001; Schimpf et al. 2006; Zanna et al. 2008) confirming that lack of functional protein product underlies the great majority of DOA cases (Pesch et al. 2001; Marchbank et al. 2002).

Only seven pathogenic missense mutations in this study were found in 12 (29%) of 42 probands (including one individual with two different missense mutations). This corresponds to frequency estimated in other studies concluding that about 30% of patients with DOA carry missense *OPA1* mutations (Amati-Bonneau et al. 2008; Ferraris et al. 2008; Hudson et al. 2008; Yu-Wai-Man et al. 2010).

Two mutations c.1034G>A and c.1148A>G in near proximity to intron–exon boundaries (2nd exonic 3′ nucleotides) were predicted to lead to an amino acid substitution. While c.1034G>A was indeed experimentally verified by Schimpf et al. (2006) to cause p.Arg345Gln, c.1148A>G leads to in-frame skipping of exon 11 changing p.Val346_Phe383del at the protein level (Baris et al. 2003) highlighting the fact that interpretation of mutations needs always to be put into context of nucleotide position within the open reading frame so that variants interfering with splicing process are not wrongly indicated as substitutions.

The clear limitation of the current study is that the majority of first degree relatives were not available for our investigation; in part, information on family history was also missing. Negative family history for DOA was reported by 38% of probands with pathogenic mutation in *OPA1* which we attribute to *de novo* occurring changes and incomplete penetrance.

Three previously reported mutations in association with DOA and one variant of unknown significance are recorded in ExAC database, each with an occurrence 1 allele of ~120 000. As it has been shown that penetrance of *OPA1* mutations may be as low as 43% (Toomes et al. 2001), in addition to mild phenotypes that may remain unnoticed if subjects do not undergo comprehensive neuro-ophthalmological examination, we think that the presence of these mutations in public datasets does not exclude their pathogenic nature. Variant c.1935+3A>G previously reported as benign (Toomes et al. 2001) has been regarded as of unknown significance as functional study could not be performed due to sample unavailability.

Further limitations of this study were that results of examinations to assess extraocular neurodegenerative impairment and hearing loss were not available for all individuals tested. Autosomal dominant optic atrophy (DOA) *plus* phenotype was therefore documented in only three probands of 42 with *OPA1* disease-causing mutations and in one proband with a missense variant classified as of unknown significance. Of the four sequence variants detected in our patients with DOA *plus* syndrome only p.(Gly456Asp) in Dynamin, GTPase domain has been previously reported to cause this phenotype (Leruez et al. 2013). Although the remaining probands were not aware of any other than visual symptoms, it needs to stressed out that mild forms of hearing impairment or peripheral neuropathy might have not been noticed.

In summary, our study expands the *OPA1* mutational spectrum and shows that the proportion of pathogenic variants leading to insufficient OPA1 protein expression level may be higher than it has been anticipated to date.

References

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS & Sunyaev SR (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods **7**: 248–249.

Alexander C, Votruba M, Pesch UE et al. (2000): *OPA1*, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat Genet **26**: 211–215.

Almind GJ, Ek J, Rosenberg T, Eiberg H, Larsen M, LuCamp L, Brøndum-Nielsen K & Grønskov K (2012): Dominant optic atrophy in Denmark – report of 15 novel mutations in *OPA1*, using a strategy with a detection rate of 90%. BMC Med Genet **13**: 1–7.

Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P et al. (2008): *OPA1* mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. Brain **131**: 338–351.

Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D et al. (2009): OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. Int J Biochem Cell Biol **41**: 1855–1865.

Anikster Y, Kleta R, Shaag A, Gahl WA & Elpeleg O (2001): Type III 3-methylglutaconic aciduria (optic atrophy plus syndrome, or Costeff optic atrophy syndrome): identification of the OPA3 gene and its founder mutation in Iraqi Jews. Am J Hum Genet **69**: 1218–1224.

Barbet F, Hakiki S, Orssaud C et al. (2005): A third locus for dominant optic atrophy on chromosome 22q. J Med Genet **42**: e1.

Baris O, Delettre C, Amati-Bonneau P, Surget MO, Charlin JF & Catier A (2003): Fourteen novel *OPA1* mutations in autosomal dominant optic atrophy including two de novo mutations in sporadic optic atrophy. Hum Mutat **21**: 656.

Bertholet AM, Millet AM, Guillermin O, Daloyau M, Davezac N, Miquel MC & Belenguer P (2013): OPA1 loss of function affects in vitro neuronal maturation. Brain **136**: 1518–1533.

Brunak S, Engelbrecht J & Knudsen S (1991): Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. J Mol Biol **220**: 49–65.

Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL & Casadio R (2009): Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. Hum Mutat **30**: 1237–1244.

Capriotti E, Calabrese R & Casadio R (2006): Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. Bioinformatics **22**: 2729–2734.

Carelli V, Schimpf S, Fuhrmann N, Valentino ML, Zanna C & Iommarini L (2011): A clinically complex form of dominant optic atrophy (OPA8) maps on chromosome 16. Hum Mol Genet **20**: 1893–1905.

Carelli V, Musumeci O, Caporali L et al. (2015): Syndromic parkinsonism and dementia associated with OPA1 missense mutations. Ann Neurol **78**: 21–38.

Chen J, Xu K, Zhang X, Jiang F, Liu L, Dong B, Ren Y & Li Y (2014): Mutation screening of mitochondrial DNA as well as OPA1 and OPA3 in a Chinese cohort with suspected hereditary optic atrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci **55**: 6987–6995.

Cho DH, Nakamura T & Lipton SA (2010): Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. Cell Mol Life Sci **67**: 3435–3447.

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR & Chan AP (2012): Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. PLoS ONE **7**: e46688.

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C & Belenguer P (2000): Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet **26**: 207–210.

Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B & Faivre L (2001): Mutation spectrum and splicing variants in the *OPA1* gene. Hum Genet **109**: 584–591.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M & Beroud C (2009): Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acids Res **37**: e67.

Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitg M, Montanyola A, Chang JM, Taly JF & Notredame C (2011): T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. Nucleic Acids Res **39**: W13–W17.

den Dunnen JT & Antonarakis SE (2000): Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. Hum Mutat **15**: 7–12.

Ferraris S, Clark S, Garelli E et al. (2008): Progressive external ophthalmoplegia and vision and hearing loss in a patient with mutations in *POLG2* and *OPA1*. Arch Neurol **65**: 125–131.

Ferre M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C & Dollfus H (2009): Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. Hum Mutat **30**: E692–E705.

Ferre M, Caignard A, Milea D et al. (2015): Improved locus-specific database for OPA1 mutations allows inclusion of advanced clinical data. Hum Mutat **36**: 20–25.

Fuhrmann N, Alavi MV, Bitoun P et al. (2009): Genomic rearrangements in *OPA1* are frequent in patients with autosomal dominant optic atrophy. J Med Genet **46**: 136–144.

Gallus GN, Cardaioli E, Rufa A et al. (2012): High frequency of *OPA1* mutations causing high ADOA prevalence in south-eastern Sicily, Italy. Clin Genet **82**: 277–282.

Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL et al. (2008): Mutation of *OPA1* causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. Brain **131**: 329–337.

Ke T, Nie SW, Yang QB et al. (2006): The G401D mutation of *OPA1* causes autosomal dominant optic atrophy and hearing loss in a Chinese family. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi **23**: 481–485.

Kerrison JB, Arnould VJ, Ferraz Sallum JM, Vagefi MR, Barmada MM, Li Y, Zhu D & Maumenee IH (1999): Genetic heterogeneity of dominant optic atrophy, Kjer type: Identification of a second locus on chromosome 18q12.2-12.3. Arch Ophthalmol **117**: 805–810.

Kim JY, Hwang JM, Ko HS, Seong MW, Park BJ & Park SS (2005): Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. Neurology **64**: 966–972.

Kjer B, Eiberg H, Kjer P & Rosenberg T (1996): Dominant optic atrophy mapped to chromosome 3q region. II. Clinical and epidemiological aspects. Acta Ophthalmol Scand **74**: 3–7.

Kumar P, Henikoff S & Ng PC (2009): Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc **4**: 1073–1081.

Leruez S, Milea D, Defoort-Dhellemmes S et al. (2013): Sensorineural hearing loss in OPA1-linked disorders. Brain **136**: e236.

Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD & Radivojac P (2009): Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. Bioinformatics **25**: 2744–2750.

Liskova P, Ulmanova O, Tesina P, Melsova H, Diblik P, Hansikova H, Tesarova M & Votruba M (2013): Novel *OPA1* missense mutation in a family with optic atrophy and severe widespread neurological disorder. Acta Ophthalmol **91**: e225–e231.

Lunkes A, Hartung U, Magarino C et al. (1995): Refinement of the *OPA1* gene locus on chromosome 3q28-q29 to a region of 2-8 cM, in one Cuban pedigree with autosomal dominant optic atrophy type Kjer. Am J Hum Genet **57**: 968–970.

Lyle W (ed.) (1990): Genetic risks. Waterloo, Ontario. University of Waterloo Press.

Manners DN, Rizzo G, La Morgia C et al. (2015): Diffusion Tensor Imaging Mapping of Brain White Matter Pathology in Mitochondrial Optic Neuropathies. AJNR Am J Neuroradiol **36**: 1259–1265.

Marchbank NJ, Craig JE, Leek JP et al. (2002): Deletion of the *OPA1* gene in a dominant optic atrophy family: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. J Med Genet **39**: e47.

Murton NJ, French L, Toomes C, Joseph SS, Rehman I, Hopkins BL, Inglehearn CF & Churchill AJ (2001): A high-density transcript map of the human dominant optic atrophy *OPA1* gene locus and re-evaluation of evidence for a founder haplotype. Cytogenet Cell Genet **92**: 97–102.

Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L et al. (2007): Effects of *OPA1* mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. J Cell Physiol **211**: 423–430.

Pesch UE, Leo-Kottler B, Mayer S, Jurklies B, Kellner U & Apfelstedt-Sylla E (2001): *OPA1* mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. Hum Mol Genet **10**: 1359–1368.

Puomila A, Huoponen K, Mantyjarvi M et al. (2005): Dominant optic atrophy: correlation between clinical and molecular genetic studies. Acta Ophthalmol Scand **83**: 337–346.

Reese MG, Eeckman FH, Kulp D & Haussler D (1997): Improved splice site detection in Genie. J Comput Biol **4**: 311–323.

Reynier P, Amati-Bonneau P, Verny C, Olichon A, Simard G & Guichet A (2004): *OPA3* gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. J Med Genet **41**: e110.

Rönnbäck C, Nissen C, Almind GJ, Gronskov K, Milea D & Larsen M (2015): Genotype-phenotype heterogeneity of ganglion cell and inner plexiform layer deficit in autosomal-dominant optic atrophy. Acta Ophthalmol **93**: 762–766.

Russo A, Delcassi L, Marchina E & Semeraro F (2013): Correlation between visual acuity and OCT-measured retinal nerve fiber layer thickness in a family with ADOA and an OPA1 mutation. Ophthalmic Genet **34**: 69–74.

Schimpf S, Schaich S & Wissinger B (2006): Activation of cryptic splice sites is a frequent splicing defect mechanism caused by mutations in exon and intron sequences of the OPA1 gene. Hum Genet **118**: 767–771.

Schimpf S, Fuhrmann N, Schaich S & Wissinger B (2008): Comprehensive cDNA study and quantitative transcript analysis of mutant *OPA1* transcripts containing premature termination codons. Hum Mutat **29**: 106–112.

Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M & Seelow D (2010): MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat Methods **7**: 575–576.

Thiselton DL, Alexander C, Taanman JW, Brooks S, Rosenberg T & Eiberg H (2002): A comprehensive survey of mutations in the *OPA1* gene in patients with autosomal dominant optic atrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci **43**: 1715–1724.

Toomes C, Marchbank NJ, Mackey DA, Craig JE, Newbury-Ecob RA & Bennett CP (2001): Spectrum, frequency and penetrance of *OPA1* mutations in dominant optic atrophy. Hum Mol Genet **10**: 1369–1378.

Votruba M, Moore AT & Bhattacharya SS (1997): Genetic refinement of dominant optic atrophy (OPA1) locus to within a 2 cM interval of chromosome 3q. J Med Genet **34**: 117–121.

Votruba M, Moore AT & Bhattacharya SS (1998): Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. J Med Genet **35**: 793–800.

Yeo G & Burge CB (2004): Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. J Comput Biol **11**: 377–394.

Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G & Chinnery PF (2009): Inherited mitochondrial optic neuropathies. J Med Genet **46**: 145–158.

Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Burke A, Sellar PW, Clarke MP & Gnanaraj L (2010): The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to *OPA1* mutations. Ophthalmology **117**: 1538: 1546 e1531.

Yu-Wai-Man P, Shankar SP, Biousse V, Miller NR, Bean LJ, Coffee B, Hegde M & Newman NJ (2011): Genetic screening for *OPA1* and *OPA3* mutations in patients with suspected inherited optic neuropathies. Ophthalmology **118**: 558–563.

Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM et al. (2008): *OPA1* mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. Brain **131**: 352–367.

Received on May 23rd, 2016.
Accepted on September 2nd, 2016.

Correspondence:
Marcela Votruba, BM BCh, FRCOphth, PhD
School of Optometry and Vision Sciences
Cardiff University
Maindy Road
Cathays
Cardiff CF24 4HQ
UK
Tel: +44 (0) 29 2087 0117
Fax: +44 (0) 29 2087 4859
Email: votrubam@cardiff.ac.uk

We thank referring physicians and all family members who took part in this study. This work was supported by UNCE 204011, PRVOUK-P24/LF1/3 and GAUK 38515/2015 programs of the Charles University, AZV 16-32341A and RVO-VFN 64165 grants from the Ministry of Health of the Czech Republic and MRC Grant G0700949.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Primer sequences used for mutation analysis of *OPA1*.
Table S2. *In silico* analysis of *OPA1* missense variants identified in patients with optic atrophy in the current study.
Table S3. *In silico* analysis of *OPA1* variants potentially affecting splicing identified in the current study.
Figure S1. Evolutionary conservation of the OPA1 protein.

Supplement 10]

***Kolarova, H.**, Honzik, T., Dudakova, L., Kousal, B., Kulhanek, J., Diblik, P., Tesarova, M., Havrankova, P., Forgac, M., Zeman, J., Liskova, P.*

Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON)

Cesk Slov Neurol N 2017; 80/113(5): 534-544.

[IF: 0,368]

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

doi: 10.14735/amcsnn2017534

Leberova hereditární neuropatie optiku

Leber Hereditary Optic Neuropathy

Souhrn

Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON) je maternálně dědičné onemocnění projevující se rychlou, nebolestivou ztrátou zraku v důsledku poruchy funkce a odumírání retinálních gangliových buněk, což v konečném důsledku vede k atrofii zrakového nervu. Více než 95 % pacientů nese jednu ze tří prevalentních bodových mutací v genech mitochondriální DNA: m.11778G>A, m.3460G>A a m.14484T>C. Všechny tři mutace zasahují některou z podjednotek komplexu I, NADH-koenzym Q_{10} oxidoreduktázy, prvního enzymu z mitochondriálního respiračního řetězce. Přítomnost mutace je nezbytný, ale nikoliv postačující patofyziologický prvek postižení zrakových funkcí, jak je patrno z neúplné penetrance onemocnění. Zcela nedávno bylo prokázáno, že včasné zahájení terapie idebenonem u pacientů po manifestaci LHON vede k významnému zlepšení výsledných zrakových funkcí, a další možnosti terapie jsou ve fázi klinických zkoušek. Neúplná penetrance, rychlý rozvoj onemocnění a velká variabilita klinického obrazu vedou ke značným diagnostickým obtížím, které mají často za následek pozdní zahájení léčby – již ve fázi nevratného poškození zrakového nervu. V roce 2013 jsme v rámci VFN v Praze vytvořili centrum multidisciplinární péče pro pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku, jehož cílem je optimalizace diagnostických a terapeutických algoritmů a studium rizikových faktorů rozvoje manifestního onemocnění.

Abstract

Leber hereditary optic neuropathy (LHON) is maternally inherited disorder characterized by subacute loss of vision due to impairment of retinal ganglion cells eventually leading to optic atrophy. Three prevalent point mutations in mitochondrial DNA: m.11778G>A, m.3460G>A, and m.14484T>C, are causative in the majority (> 95%) of cases. All of these mutations affect one of the subunits of complex I, NADH-ubiquinone oxidoreductase, the first enzyme of the mitochondrial respiratory chain. The presence of a mutation is necessary but not sufficient to cause visual loss. The penetrance is incomplete with only about 50% of men and 10% of women event. developing clinical signs of the disease. Recently, it was proven that early initiation of therapy with idebenone in patients manifesting LHON ameliorates visual functions and clinical trials testing several other promising therapies are underway. Incomplete penetrance, similarites with other disorders affecting the optic nerve and a great variability of clinical features cause considerable diagnostic difficulties. Often there is a delay in therapy initiation, as late as in the phase of the irreversible optic nerve damage. In 2013, we established a multidisciplinary medical care centre dedicated to patients with mitochondrial optic neuropathies in General University Hospital in Prague to develop effective diagnostic and treatment algorithms and to study the underlying pathogenetic mechanisms.

Práce byla podpořena grantem AZV 16-32341A a výzkumnými záměry SVV 260367, VFN-RVO 64165, UNCE 204011 a PROGRES-Q26/LF1.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.
Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

H. Kolářová[1], T. Honzík[1], Ľ. Ďuďáková[2], B. Kousal[3], J. Kulhánek[1], P. Diblík[3], M. Tesařová[1], P. Havránková[4], M. Forgáč[4], J. Zeman[1], P. Lišková[2,3]

[1] Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze
[2] Ústav dědičných metabolických poruch, 1. LF UK a VFN v Praze
[3] Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze
[4] Neurologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

✉ doc. MUDr. Petra Lišková, MD, Ph.D.
Ústav dědičných metabolických poruch
1. LF UK a VFN v Praze
Ke Karlovu 455/2
128 08 Praha 2
e-mail: Petra.Liskova@lf1.cuni.cz

Přijato k recenzi: 18. 3. 2017
Přijato do tisku: 1. 8. 2017

Klíčová slova

LHON – optická neuropatie – optická atrofie – mitochondrie – mtDNA – sclerosis multiplex

Key words

LHON – optic neuropathy – optic atrophy – mitochondria – mtDNA – multiple sclerosis

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

Úvod

Postižení oka patří spolu s encefalopatií a myopatií mezi nejběžnější projevy mitochondriální dysfunkce a zahrnuje oftalmoplegii anebo ptózu, pigmentovou degeneraci sítnice, makulopatie a neuropatie optiku. Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON, OMIM 535000) představuje nejčastější příčinu mitochondriálních neuropatií optiku způsobující progresivní ztrátu zraku. Přestože byla mitochondriální onemocnění dříve považována za poměrně vzácná, jejich současná prevalence je, především díky zlepšení diagnostiky, odhadována až na 1 : 5 000 živě narozených dětí [1]. Jedná se o heterogenní skupinu poruch, které se manifestují zejména multisystémovým postižením, ale vzácněji se mohou projevit také izolovanou dysfunkcí jednoho orgánu.

Onemocnění LHON bylo poprvé rozpoznáno německým oftalmologem Albrechtem von Graefem v roce 1858, avšak pojmenováno bylo po jeho asistentovi Theodoru Leberovi, který později popsal klinický průběh onemocnění u 15 pacientů [2]. LHON je první onemocnění, jež bylo asociováno s maternální dědičností a konkrétní bodovou mutací v mitochondriální DNA (mtDNA) [3,4]. Více než 95 % pacientů nese jednu ze tří prevalentních bodových mutací v genech mtDNA: m.11778G>A, m.3460G>A a m.14484T>C (obr. 1) [5]. Všechny tři mutace zasahují některou z podjednotek komplexu I, NADH-koenzym Q_{10} oxidoreduktázy, prvního enzymu z mitochondriálního respiračního řetězce [6]. Přítomnost mutace je nezbytný, nikoli však jediný patofyziologický prvek postižení zrakových funkcí. Přestože se u mitochondriálních onemocnění dříve předpokládalo, že práh pro manifestaci onemocnění (tzv. trigger point) je asi 80–90 % mutovaných mtDNA molekul v buňce, naprostá většina všech symptomatických i asymptomatických jedinců s LHON nese mutace v homoplazmické podobě (stav, kdy jsou v buňce všechny molekuly mtDNA stejné, zde tedy ve 100 % mutované). Předpokládá se, že k rozvoji manifestního onemocnění je nutná souhra několika endogenních i exogenních faktorů.

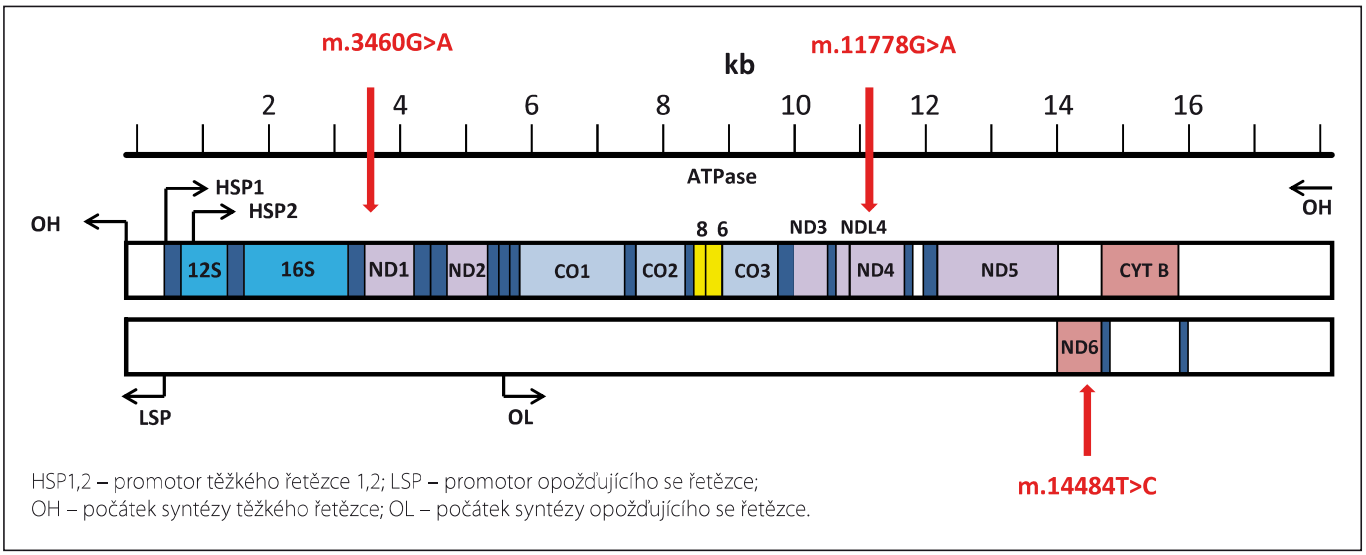
Přesná data o výskytu LHON nejsou, na rozdíl od jiných evropských států, v České republice k dispozici. Prevalence manifestního onemocnění se v Anglii pohybuje okolo 1 : 31 000 (prevalence jedinců s potvrzenou mutací, tzv. asymptomatických nosičů, je však odhadována až na 1 : 8 500) [7,8], 1 : 39 000 v Nizozemí [9] a 1 : 50 000 ve Finsku [10] a 1 : 54 000 v Dánsku. Mezi lety 1992 a 2016 bylo na našem pracovišti diagnostikováno přes 90 jedinců české národnosti s jednou ze tří prevalentních mutací, z čehož 20 bylo symptomatických. Pokud počítáme s obdobnou prevalencí jako na britských ostrovech a Nizozemí, kde je i obdobné mtDNA haploskupinové rozložení, mělo by u nás být odhadem přes 300 asymptomatických nosičů a 80–90 pacientů s manifestním onemocněním. Je tedy zřejmé, že onemocnění je v České republice značně poddiagnostikováno.

Lékaři prvního kontaktu s pacienty majícími LHON jsou nejčastěji oční lékař nebo neurolog. Vzhledem k tomu, že toto onemocnění bývá často nesprávně vyhodnoceno a následně i léčeno jako roztroušená skleróza (RS) či neuromyelitis optica (NMO) neboli morbus Devic, od kterých je v první fázi prakticky neodlišitelné, dochází často k opožděnému zahájení správné terapie, která pak nedosahuje odpovídajících výsledků. Prostřednictvím tohoto souhrnného pojednání představujeme základní charakteristiky a specifika onemocnění LHON.

Klinický průběh onemocnění

Klinický průběh LHON obvykle zahrnuje rychlou nebolestivou ztrátu zrakové ostrosti obou očí během několika dnů až týdnů (subakutní průběh). K rozvoji klinických příznaků dochází obvykle mezi 15 a 35 roky, přičemž u 90 % pacientů se onemocnění projeví do 50 let věku [11]. Rozvoj poruchy zrakových funkcí se však může objevit i v průběhu první dekády života [12,13] či velmi zřídka až po 70.–80. roce věku [14]. Muži mají 4–5× větší pravděpodobnost, že se u nich choroba projeví. Pohlaví ani příčinné mutace ovšem nemají vliv na to, kdy onemocnění vznikne a jak závažná bude ztráta zrakových funkcí při manifestaci [11].

Obvykle dochází během 4–6 týdnů na jednom oku k progresivnímu snižování zrakové ostrosti a výrazné poruše barvocitu a kontrastní citlivosti. První obvykle bývají



HSP1,2 – promotor těžkého řetězce 1,2; LSP – promotor opožďujícího se řetězce;
OH – počátek syntézy těžkého řetězce; OL – počátek syntézy opožďujícího se řetězce.

Obr. 1. Linearizovaná strukturální mapa mitochondriální DNA (převzato z [111]).
Červené šipky označují 3 LHON prevalentní mutace v genech kódujících ND1, ND4 a ND6 podjednotky komplexu I.

Fig. 1. The linearized structural map of the human mtDNA (modified from [111]).
The three prevalent LHON mutations in genes encoding ND1, ND4 and ND6 subunits of the Complex I are marked by arrows.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

zasažena nejtenčí vlákna papilomakulárního svazku, což se projevuje jako vznik centrocekálních skotomů (obr. 2A, B) [5,15]. Zornicové reflexy zůstávají v porovnání s rozsahem ztráty zraku relativně zachovány. To má význam v diferenciální diagnostice tohoto onemocnění [16,17]. Stejné symptomy se po průměrné době 6–8 týdnů rozvinou na oku druhém [13]. U naprosté většiny pacientů jsou postupně postiženy obě oči během 6 měsíců [11]. Asi ve 25 % případů dochází ke ztrátě zrakových funkcí současně u obou očí již na začátku onemocnění [11].

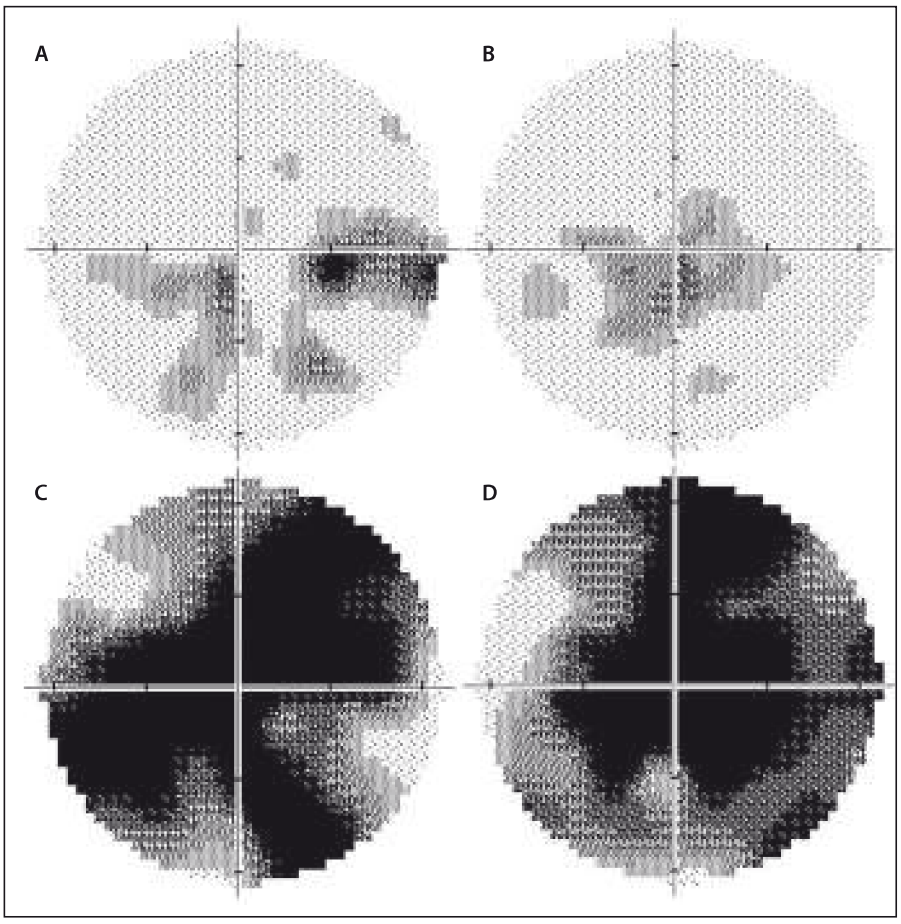
Na očním pozadí bývá v akutní fázi patrné prosáknutí papily zrakového nervu s rozšířením a zvýšenou vinutostí cirkumpapilárních cév (teleangiektatická mikroangiopatie) (obr. 3A). Při fluorescenční angiografii však nedochází k úniku barviva, což vytváří obraz tzv. pseudoedému [20]. Ztluštění vrstvy retinálních nervových vláken (RNFL) v okolí disku lze objektivizovat např. pomocí optické koherenční tomografie se spektrální doménou (SD-OCT) (obr. 3B). Při vyšetření zrakových evokovaných potenciálů (VEP) a elektroretinografie (ERG) je prokazováno v akutní fázi snížení amplitud a prodloužení latencí kortikálních odpovědí (obr. 4A, B) [18]. Je třeba zdůraznit, že přibližně 20 % pacientů má na očním pozadí normální nález, což může vést k nesprávné diagnóze funkční poruchy zraku [12,13,19,20].

Během 6 týdnů od manifestace se zrakové funkce stabilizují a onemocnění přechází do chronické fáze na podkladě progresivní atrofie zrakového nervu, kterou lze objektivizovat průkazem ztenčování RNFL [21]. K rozvoji kompletní atrofie dochází minimálně po dobu 12 měsíců [22], nejprve v oblasti temporálního a dolního kvadrantu a následně i v kvadrantu horním a nazálním, který je někdy relativně ušetřen (obr. 3C, D) [15,21]. Postižení zrakových funkcí je závažné – u většiny pacientů vznikají rozsáhlé centrální skotomy (obr. 2C, D) a zraková ostrost je významně snížená až do pásma těžké slabozrakosti tj. ≤ 0,1 dle WHO (odpovídá 3/60–1/60, resp. 0,05–0,02 na Snellenových optotypech a 1,0 logMAR), či praktické slepoty (1,3 logMAR; ≤ 1/60, resp. 0,02 [23].

Po odeznění akutní fáze popisují některé studie možné zlepšení zrakových funkcí, a to častěji u mladších pacientů (< 10 let), kteří mívají akutní fázi prodlouženou s pomalejším úbytkem zrakových funkcí a u pacientů s relativně velkými terči zrakového nervu [24,25]. Je známo, že i mezi jednotlivými mutacemi existují rozdíly v penetranci onemocnění a závažnosti projevů, především konečného stavu zrakových funkcí (tab. 1) [26]. Nejčastěji je spontánní zlepšení popisováno u mutace m.14484T>C (ve 37–64 %) [9,27,28]. Oproti tomu u m.3460G>A je podíl pacientů s návratem zrakových funkci jen 15–25 % [9,20,29] a u m.11778G>A pouze 4–25 % [20,30,31].

Výjimečně může u některých jedinců nesoucích LHON prevalentní mutaci vznikout pouze mírné postižení funkce zrakového nervu, které se projevuje jako porucha barvocitu s neschopností rozlišovat nejčastěji červenou a zelenou barvu, snížení kontrastní citlivosti a lehce abnormální ERG a VEP [32].

Je zajímavé, že abnormality při vyšetření fundu a vyšetření sítnice pomocí SD-OCT (např. cirkumpapilární teleangiektatická mikroan-

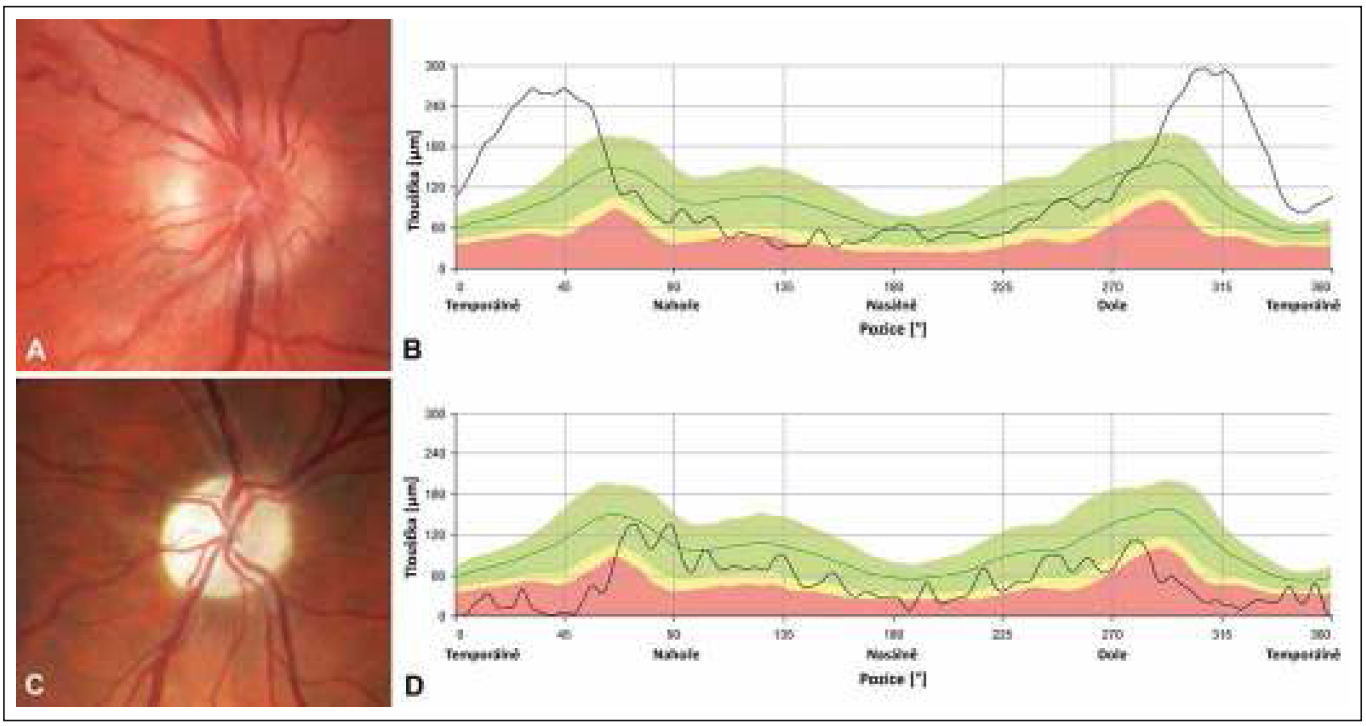


Obr. 2. Vyšetření zorného pole u dvou pacientů s LHON na podkladě m.11778G>A mutace.
Dvaatřicetiletý pacient 15 let po manifestaci: na pravém oku je několik relativních centrálních skotomů, nazálně až absolutních (A); stav odpovídá nejlepší korigované zrakové ostrosti 0,1. Na levém oku je přítomen centrocékální skotom (B); nejlepší korigovaná zraková ostrost je 0,66. Jedenatřicetiletý pacient 3 roky po manifestaci: absolutní centrální skotomy na pravém (C) i levém (D) oku, které odpovídají nízké zrakové ostrosti 0,016 na obou očích. Nálezy dokumentují širokou variabilitu výsledného postižení u pacientů se stejnou, homoplazmickou mutací v mitochondriální DNA. Zraková ostrost byla vyšetřena na Snellenových optotypech a převedena na desetinné hodnoty.

Fig. 2. Automated perimetry in two LHON patients with the m.11778G>A mutation.
A 32-year-old patient 15 years after the disease manifestation: several relative to absolute central scotomas nasally in the right eye (RE); the best corrected visual acuity is 0.1 (A). Centrocaekal scotoma in the left eye (LE, B); the best corrected visual acuity is 0.66. A 31-year-old man 3 years after the disease manifestation: absolute central scotoma in the RE (C) and in the LE (D), corresponding to low visual acuity of 0.016 in both eyes. These findings document the variability in final visual impairment in patients carrying the same homoplasmic mutation in mitochondrial DNA. The visual aquity was measured using Snellen charts and converted to decimal numbers.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017



Obr. 3. Nálezy na terčích zrakového nervu u dvou pacientů s LHON.
Barevná fotografie papily zrakového nervu pravého oka 20letého muže s m.11778G>A mutací v době akutní fáze onemocnění, lze pozorovat pseudoedém a vinuté, rozšířené cévy při okraji (A); měření tloušťky vrstvy nervových vláken (RNFL) peripapilárně dokládá zvýšení nad normativní databázi (zelené pásmo) temporálně, zatímco nazálně a nahoře lze již detekovat počínající atrofii (žluté a červené pásmo) (B). Barevná fotografie papily zrakového nervu pravého oka 26letého muže s m.11778G>A 6 let po manifestaci onemocnění, terč je výrazně bledý, což odpovídá těžké atrofii (C); měření RNFL dokládá úbytek této vrstvy, hodnoty jsou převážně patologické nebo hraniční (červené a žluté pásmo), dále dochází ke ztrátě charakteristické dvojitě vlnité kontury křivky (zelená linie) (D).

Fig. 3. Optic nerve heads findings in two patients with LHON.
Colour photograph of the right optic disc of a 20-year-old male with m.11778G>A mutation in acute disease stage showing pseudoedema, telangiectasia and increased tortuosity of retinal vessels (A); peripapillary retinal nerve fibre layer measurements show increased thickness above the normative database (green band) temporally while in the nasal and superior quadrants there is already a RNFL thickness reduction (yellow and red band) (B). Colour photograph of the right optic nerve head of a 26-year-old male with m.11778G>A mutation 6 years after the disease onset, the disc is pale corresponding to severe atrophy (C); RNFL measurements confirm thinning, most values are within the pathological or borderline range (red and yellow band), the typical normal pattern of RNFL striations is absent (green line) (D).

Tab. 1. Variabilita penetrance v závislosti na konkrétní mutaci a pohlaví.

Mutace	Penetrance [%]		Poměr muži/ženy*	Zdroj
	Muži	Ženy		
m.3460G>A	32–49	15–28	1,7–4; 3 : 1	[7,112]
m.11778G>A	43–51	9–11	3,7–5; 1 : 1	[7,20]
m.14484T>C	47	8	7,7 : 1	[28]

*počítáno z absolutních čísel v uvedené literatuře.

giopatie, ztluštění RNFL) byly pozorovány také u jedinců v presymptomatickém stadiu nemoci, a dokonce u asymptomatických nosičů mutace, u kterých se nikdy nerozvinul klinický obraz ztráty zrakových funkcí [12,33]. Často se jedná pouze o diskrétní změny; během života však může docházet k jejich minimalizaci až úplnému vymizení nebo naopak k jejich zvýraznění [34]. Subklinické odchylky byly pozorovány i v rámci elektrofyziologických vyšetření VEP a ERG [34,35]. Livingstone et al (1980) studovali 16 asymptomatických nosičů. U jednoho nalezli alterace při vyšetření VEP a zvažovali, zda se může jednat o časnou známku rozvoje onemocnění [36]. Signifikantní prodloužení vlny P100 při vyšetření VEP bylo prokázáno i ve skupině 48 asymptomatických nosičů mutace m.11778G>A, u kterých nikdy nevznikla trvalá porucha zraku [35]. Je tedy více než pravděpodobné, že strukturní změny nekorelují s klinickým fenotypem, a prediktivni hodnota vyšetření VEP i dalších funkčních i zobrazovacích vyšetření proto stále zůstává nejistá.

Jednostranné postižení zrakového nervu je u LHON extrémně vzácné, v těchto případech je třeba aktivně hledat a vyloučit jiné patologické procesy [11]. Popsáno bylo u dětí, nicméně i v těchto případech bylo spojeno buď se subklinickým postižením oka druhého, nebo s manifestací na druhém oku v časné dospělosti po dlouhém asymptomatickém intervalu [24] (osobní komunikace, prof. Carelli).

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

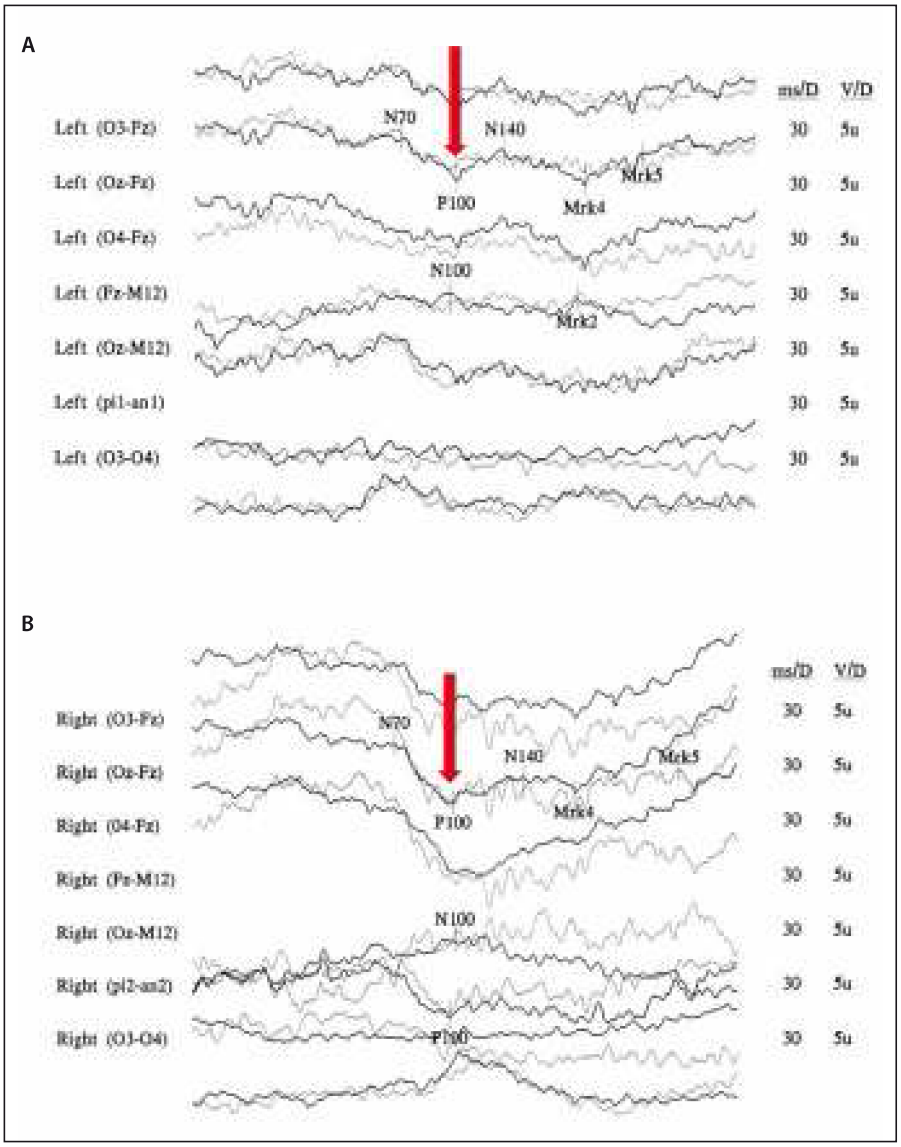
Extraokulární manifestace

Přestože se LHON nejčastěji projevuje jako izolované postižení zrakového nervu, v některých případech se onemocnění může komplikovat i dalšími doprovodnými příznaky, jakými jsou např. periferní neuropatie, myopatie, převodní poruchy srdečního rytmu a dyskineze končetin [37]. Stále však není jasné, zda jejich, obvykle velmi izolovaný, výskyt nepředstavuje jen pouhou koincidenci. Vzácněji byly u pacientů pozorovány neurologické projevy závažnějšího charakteru, jako např. spastická dystonie, ataxie, juvenilní encefalopatie a psychiatrické poruchy, které bývají označovány jako LHON *plus* nebo jako překryvné (tzv. overlapping) syndromy. Jejich výskyt bývá vázán na jiné mutace ovlivňující aktivitu komplexu I či jde o ojedinělé případy z geograficky omezených oblastí [38–45].

Výše bylo uvedeno, že odlišení LHON od RS v akutní fázi onemocnění činí značné diagnostické obtíže. Tento fakt se dále komplikuje stále neobjasněnou otázkou možné asociace LHON s RS (tzv. syndrom Hardingové) [46]. U naprosté většiny pacientů s LHON je v akutní fázi onemocnění obraz na MR bez patologického nálezu [47]. V atrofické fázi mohu být na MR naopak patrny hypersignality optického nervu na podkladě gliózy [48]. Část pacientů s LHON však rozvíjí klinický i radiologický obraz neodlišitelný od RS s nálezem charakteristických lézí bílé hmoty v periventrikulárních oblastech a oligoklonálních IgG pásů při vyšetření mozkomíšního moku [49–51]. Pacienti se manifestují opakovanou poruchou zrakových funkcí spojenou s bolestí za okem hlavně při jeho pohybu [52]. V těchto případech obvykle nedochází ke kompletní obnově zrakových funkcí po nasazení terapie kortikosteroidy a v polovině případů u pacientů porucha progreduje do praktické slepoty [52]. Druhá skupina pacientů s LHON však má pouze radiologické známky RS a otázka jejich budoucí manifestace zatím zůstává nejasná [53]. Někteří autoři uvádějí až 50× vyšší riziko rozvoje RS ve skupině LHON pacientů, a to především u symptomatických žen [13,46,51–54]. Pokud se tedy žena s LHON manifestuje ztrátou zraku, lze očekávat závažnější průběh neurologického postižení než u mužů. Existují teorie, které naznačují, že primární mtDNA mutace může spouštět autoimunitní odpověď vedoucí k demyelinizaci axonů a rozvoji RS [46,51]. Další možným vysvětlením je, že velké neurologické poškození při RS může vést k sekundárnímu mitochondriálnímu poškození, a podmiňovat tak rozvoj LHON [53]. V současnosti nepanuje v otázce vyššího výskytu RS ve skupině pacientů s LHON shoda, neboť část odborníků je přesvědčena, že se jedná o pouhé populační riziko [52].

Diagnostika

Podezření na onemocnění LHON často vyslovuje již oční lékař nebo neurolog, a to na základě správného odebrání anamnézy a zhodnocení podrobného očního vyšetření spočívajícího ve vyšetření zrakové ostrosti, zorného pole, kontrastní citlivosti, barvocitu, popř. RNFL. Zlatým standardem laboratorní diagnostiky je posléze molekulárně genetická analýza prevalentních mutací ze vzorků krve či z buněk stěru bukální sliznice. Toto vyšetření se provádí u pacientů s již rozvinutou poruchou zraku v rámci diferenciální diagnostiky LHON či u rodinných příslušníků, kteří zatím nemají klinické obtíže, a kteří se

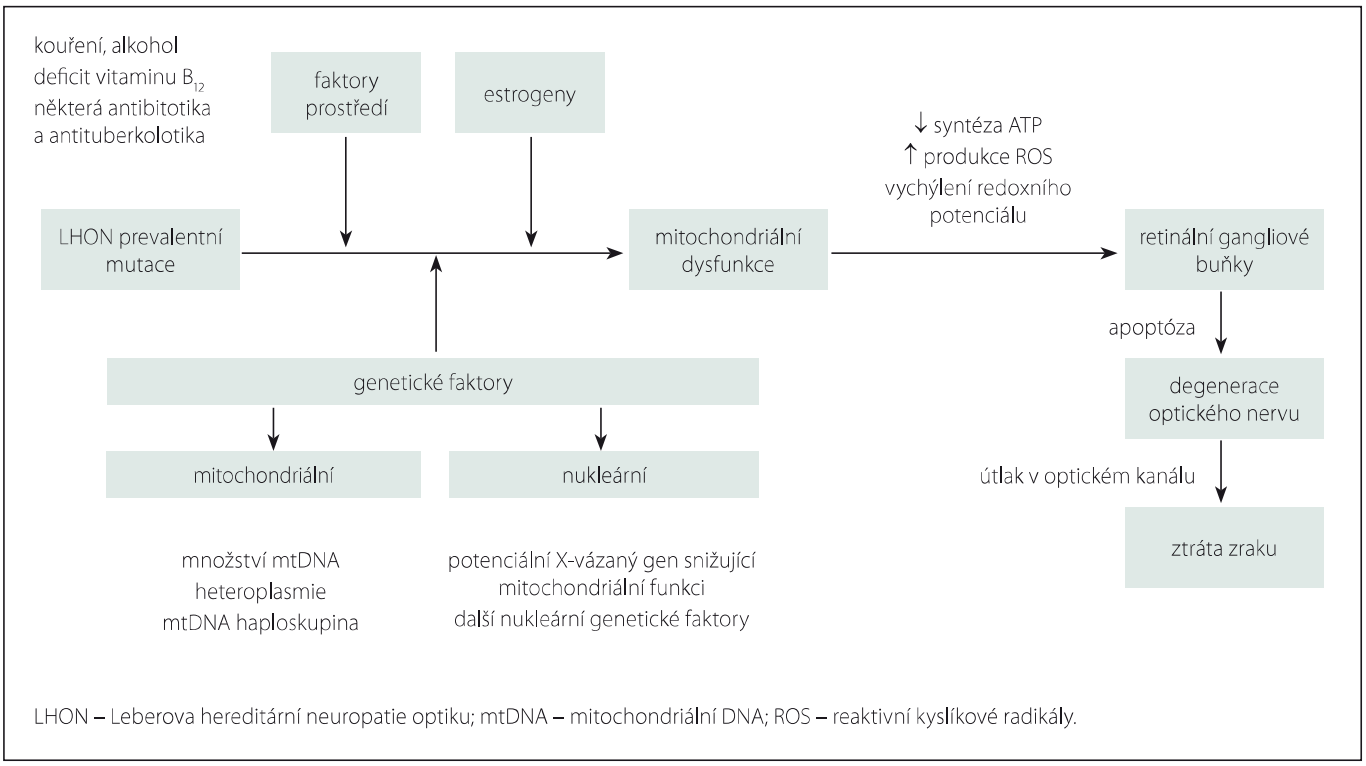


Obr. 4. Snížení amplitudy a prodloužení latence kortikálního komplexu zrakových evokovaných potenciálů (VEP) u 29letého muže s m.3460G>A mutací v chronické fázi onemocnění. Amplituda N75/P100 levého oka (OL) 3,45 μV (A) a pravého oka (OP) je 6,4 μV (B) (norma na pracovišti > 5 μV). Latence vlny P100 (červené šipky) OP je 143,3 ms a OL 139,8 ms (norma na pracovišti < 112 ms).

Fig. 4. Decreased amplitudes and prolonged peak latencies on Visual evoked potentials (VEP) analysis in 29-year-old man with m.3460G>A mutation. Amplitude of wave N75/P100 from the left eye (LE) 3,45 μV (A) and from the right eye (RE) is 6,4 μV (B) (controls > 5 μV). P100 wave latencies (marked by red arrows) from the RE is 143,3 ms and from the LE 139,8 ms (controls < 112 ms).

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017



LHON – Leberova hereditární neuropatie optiku; mtDNA – mitochondriální DNA; ROS – reaktivní kyslíkové radikály.

Obr. 5. Schématické znázornění známých faktorů ovlivňujících rozvoj degenerace optického nervu u LHON.
Fig. 5. Schematic representation of the known factors affecting the optic nerve degeneration in LHON.

tak vyhnou náročnému diagnostickému procesu. Molekulárně genetické vyšetření však u těchto asymptomatických pacientů neumožňuje predikovat rozvoj onemocnění. Při vyloučení prevalentních mutací je vhodné zvážit sekvenaci mtDNA genů kódujících podjednotky komplexu I v mitochondriích izolovaných ze svalové biopsie.

Patogeneze onemocnění

Přestože je LHON vzhledem k četnosti jeho výskytu jedno z nejvíce studovaných mitochondriálních onemocnění, mnoho důležitých otázek stále zůstává neobjasněných. Proč jsou u tohoto onemocnění postiženy prakticky výlučně RGB tvořící zrakový nerv? Proč se v jedné rodině nesoucí stejnou a ve většině případů homoplazmickou mutaci projeví onemocnění jen v některých případech? Jaké je vysvětlení pro někdy až osminásobně vyšší výskyt symptomatického onemocnění u mužů (tab. 1)? Souhrnný výčet známých faktorů ovlivňujících penetranci onemocnění je uveden ve schématu na obr. 5.

Jedním z možných vysvětlení selektivního postižení RGB jsou jejich vysoké nároky na nepřetržitou dodávku ATP (adenosintrifosfát). Histochemickými studiemi bylo prokázáno zvýšené nahromadění mitochondrií v oblasti *lamina cribrosa sclerae*, kde ještě nemyelinizovaná nervová vlákna opouští sítnici, aby vytvořila zrakový nerv [5]. Tato oblast je bohatá na enzymy ze skupiny Na^+/K^+ ATPáz, což činí z místního neuronálního vedení energeticky nesmírně náročný proces a může vysvětlit výjimečnou zranitelnost prelaminárních vláken zrakového nervu [55]. Defekt mitochondriálního metabolizmu má za následek lokální stázu axoplazmy s otokem, který dále přispívá k degeneraci vrstvy RGB a jejich axonů tvořících zrakový nerv [56]. Proti této teorii stojí fakt, že fotoreceptory, které jsou u LHON zachovány, mají mnohem vyšší oxidativní nároky než RGB [57,58]. Navíc jiná mitochondriální onemocnění se závažnější poruchou komplexu I nevedou vždy k rozvoji atrofie optiku [6]. Je proto možné, že spíše než na nedostatek ATP jsou RGB citlivé na drobná vychýlení buněčného redoxního potenciálu a produkci kyslíkových radikálů (Reactive Oxygen Species; ROS) [59].

Klinický i patogenetický obraz LHON se částečně překrývá s obrazem dominantní atrofie optiku (DOA, OMIM 165500) na podkladě mutací v nukleárním genu *OPA1*. Tento gen kóduje protein ze skupiny dynaminů, který je odpovědný za udržování integrity mitochondriálního genomu, tvorbu krist a fúzi mitochondrií [60,61]. Zdá se proto, že správná funkce RGB je závislá na zachovalé biogenezi mitochondrií. Giordano et al ve své studii prokázali, že množství mtDNA u LHON negativně koreluje s rozvojem axonálního otoku a dalších subklinických změn u pacientů s LHON, a vyslovili hypotézu, že zvýšená mitochondriální biogeneze na podkladě replikace mtDNA může být významný protektivní faktor rozvoje manifestního onemocnění [62]. Na základě této teorie by k rozvoji manifestního onemocnění došlo pouze u těch nosičů mutace, kteří ztratí schopnost zvýšit svou mitochondriální biogenezi. Stanovení množství mtDNA by tak v budoucnu mohlo sloužit jako významný biomarker prognózy onemocnění [62]. Dosud však nejsou k dispozici longitudinální data, která by tuto teorii potvrdila.

Sadun et al udávají, že svou roli v penetranci onemocnění hrají i další nukleární či mitochondriální genetické faktory [63]. Výše byly uvedeny rozdíly v závažnosti projevů a penetranci onemocnění mezi třemi prevalentními mutacemi [13]. Přídatný negativní efekt na prevalentní mutaci a rozvoj klinicky manifestního onemocnění mohou mít přidružené mtDNA polymorfizmy. Během evoluce došlo k jejich segregaci v tzv. haploskupinách, které se následně dědily spo-

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

lečně. V Evropě bylo popsáno celkem 11 haploskupin [64]. Na základě fylogenetických studií byla prokázána preferenční asociace prevalentních mutací LHON s haploskupinou J přítomnou u 9 % evropské populace [65–67]. V České republice, která má obdobné haploskupinové rozložení jako zbytek Evropy, je její frekvence odhadována na 8 %. [64]. Buněčné linie nesoucí mutaci m.11778G>A a haploskupinu J měly prokazatelně nižší spotřebu kyslíku v porovnání s liniemi nesoucími pouze mutaci [68]. Největší asociace s touto haploskupinou byla prokázána u m.14484T>C (80 %) [69]. Naopak m.3460G>A se zdá být mezi jednotlivými haploskupinami distribuována víceméně náhodně [70], což by dále potvrzovalo její závažnost a vysokou penetranci bez nutnosti působení přídatných rizikových faktorů [71].

Přestože naprostá většina pacientů s LHON má mutace v homoplazmické podobě, 10–15 % mutací je heteroplazmických a tkáňově specifická segregace může být odpovědná za rozdílný interindividuální fenotyp [6,20,72]. Některé studie naznačují, že u pacientů je riziko minimální, pokud je heteroplazmie nižší než 60 % [73]. Matky, které mají hladinu heteroplazmie rovnou nebo nižší 80 %, mají menší pravděpodobnost, že u jejich synů dojde k manifestaci onemocnění [73]. Kazuistiky dvou symptomatických pacientů s 15% a 26% hladinou heteroplazmie v leukocytech ale spíše poukazují na její nízkou korelaci s fenotypem [74,75] nebo na odlišnou hladinu heteroplazmie v různých tkáních. Studie Howella et al popsala 33% hladinu heteroplazmie v leukocytech periferní krve v porovnání s 95%, resp. 100% hladinou heteroplazmie ve zrakovém nervu a sítnici [76].

Prevalence heteroplazmie je nejvyšší u m.3460G>A (40 %) oproti 36,4 % u m.14484T>C a 5,6 % u m.11778G>A [75]. Heteroplazmie pacientů s LHON se navíc může v čase měnit; u m.3460G>A mutace segregační analýza leukocytů periferní krve prokázala genetický drift vedoucí k vyšší frekvenci mutovaných alel u následujících generací [72,75,77], ale naopak možnou negativní selekci wild-type alel hematopoetických buněk v průběhu života [78]. Kromě toho existují teorie, které naznačují, že heteroplazmie je pouze přechodné stadium od jednoho homoplazmického (wild-type) stadia ke stadiu homoplazmickému (mutovanému) [75]. Výskyt heteroplazmie v konkrétní rodině by tak naznačoval, že se mutace odehrála relativně nedávno [75]. Dle této teorie by i mutace m.3460G>A, která má největší procento heteroplazmických případů mohla být fylogeneticky nejmladší.

Velmi diskutovanou otázkou je i výskyt LHON u ženských nositelek mutace, které mají v závislosti na konkrétní genetickém pozadí jednoznačně nižší penetranci než muži (tab. 1). Některé studie naznačují, že za rozdílnou penetrancí by mohl stát modifikující X-vázaný gen, který povede k manifestaci u žen pouze v homozygotním stavu či X-inaktivací wild-type X chromozomu [79]. Do dnešního dne bylo popsáno několik možných lokusů, které by mohly zvyšovat náchylnost ke vzniku manifestního onemocnění [20,80]; konkrétní gen však zatím nebyl potvrzen. Kromě toho nebyla v leukocytech postižených žen sešikmená inaktivace X chromozomu nalezena [81–84]. Velmi diskutovanou otázkou je i protektivní úloha estrogenů (obr. 5). Zdá se, že zvýšeného kompenzačního potenciálu je u žen docíleno několika mechanizmy jejich působení: aktivací antioxidačního enzymu superoxiddismutázy 2, zvýšením mitochondriální biogeneze a malým, ale prokazatelným zvýšením buněčné energetické kapacity [85]. Těchto poznatků může být využito v potenciálním terapeutickém ovlivnění estrogenového receptoru β (ER-β), hojně přítomném v RGB [85].

V neposlední řadě je nutno zmínit úlohu faktorů prostředí, které mohou mít vliv na manifestaci onemocnění. Na prvním místě stojí nepochybně kouření. Studie 206 asymptomatických nositelů mutace prokázala 93 % penetranci u mužů kuřáků [23]. Ve stejné studii byl potvrzen pouze statisticky nevýznamný trend zvýšené manifestace onemocnění u pacientů konzumujících nadměrné množství alkoholu, přesto je vzhledem k závažnosti klinických projevů rozumné pacientům doporučit, aby omezili nadměrné, a především nárazové pití alkoholu [23]. Jako další možný rizikový faktor rozvoje manifestního onemocnění je uváděn i nedostatek vitaminu B_{12} [86,87]. Ve vztahu k endosymbiotické teorii poukazující na bakteriální původ mitochondrie je na zvážení užití antibiotik a antituberkulotik interferujících s jejich proteosyntetickým aparátem (makrolidy, aminoglykosidy, etambutol, izoniazid a linezolid) [23,37]. Na základě našich zkušenosti si ale nemyslíme, že by standardní 2–3týdenní terapie antibiotiky vedla k rozvoji manifestního onemocnění.

Diferenciální diagnostika

Jakýkoli zásah poškozující RGB anebo jejich axony může mít za následek rozvoj neuropatie optiku. Atrofie zrakového nervu mohou vzniknout na podkladě ischemických, infiltrativních, toxických, nutričních, útlakových a traumatických procesů probíhajících v oblasti orbity, chiazmatu či průběhu tractus opticus. V diferenciální diagnostice je dále nutno odlišit refrakční vady (astenopické obtíže) a psychosomatické obtíže způsobující tzv. funkční poruchy zraku.

Hlavní diagnostické rozpaky způsobuje především několik demyelinizačních zánětlivých onemocnění, které na rozdíl od LHON většinou odpovídají na terapii kortikosteroidy. Patří mezi ně především RS, NMO a chronická recidivující zánětlivá neuropatie optiku (Chronic Relapsing Inflammatory optic Neuropathy; CRION) [88]. Oproti LHON se RS vyskytuje mnohem častěji u žen. Ztráta zraku bývá obvykle pouze jednostranná a doprovází ji tlak až bolesti za okem při jeho pohybech [89]. Také progrese zrakové dysfunkce bývá spíše akutního rázu (1–3 dny) a většinou nebývá tak závažná jako u LHON [89]. Podobně se manifestuje i jiné, vzácnější autoimunitní onemocnění, kterým je CRION [90]. Jak retrobulbární neuritida v rámci RS, tak CRION mají oproti LHON často porušeny zornicové reflexy [91]. NMO byla dříve považována za formu RS [92,93]. Příčina tohoto onemocnění byla prokázána v tvorbě protilátek proti akvaporinu 4 (AQP4-IgG), které po navázání na cílový antigen spouštějí komplementovou kaskádu a lokální zánětlivou reakci se všemi jejími důsledky [94,95]. Vyšetření těchto protilátek může pomoci v diferenciální diagnostice těchto onemocnění [96].

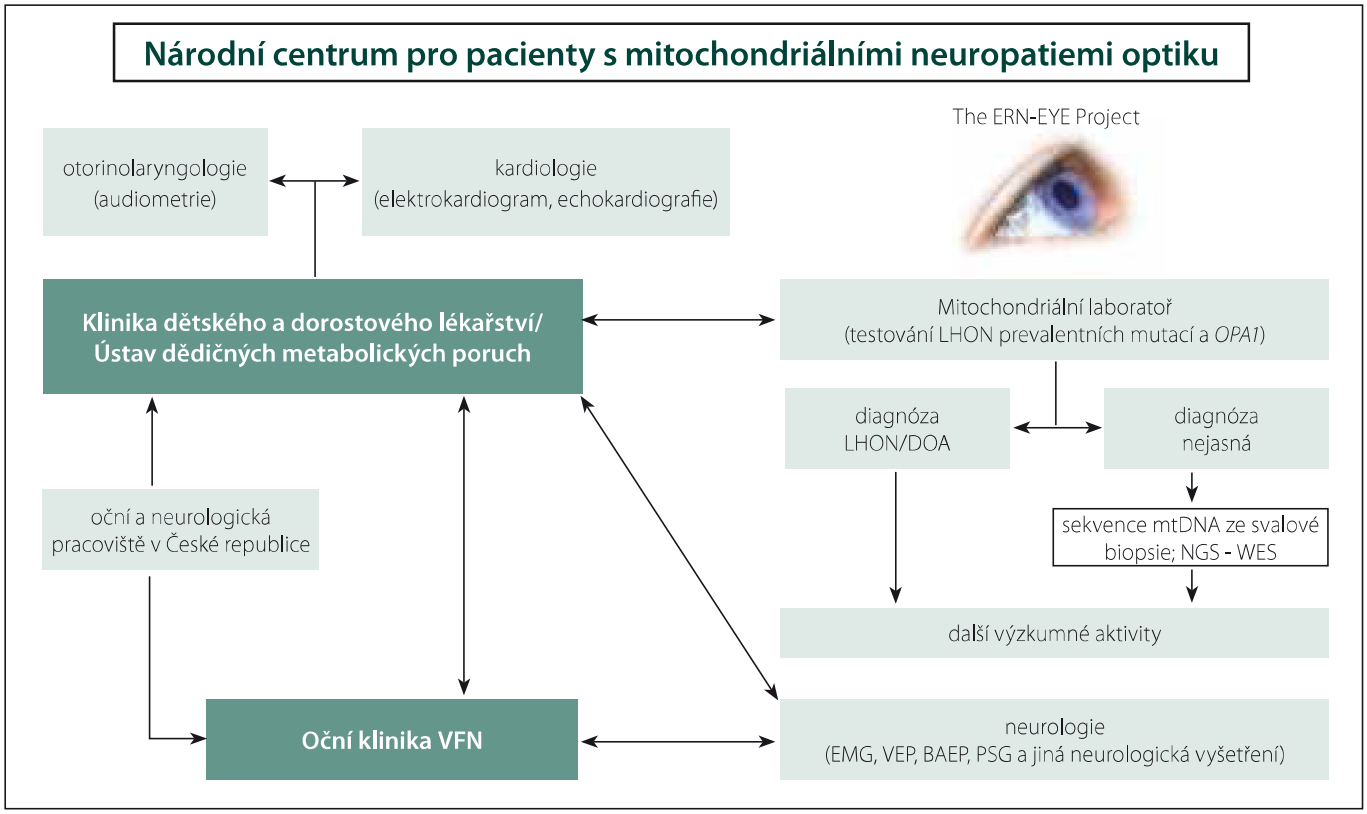
Hlavní hereditární neuropatií optiku, kterou je nutno vyloučit v rámci diferenciální diagnostiky LHON, je DOA, jež nejčastěji vzniká na podkladě mutací v *OPA1*. DOA postihuje ve stejném poměru ženy i muže a nejčastěji se manifestuje během prvních dvou dekád života bilaterální poruchou zrakové ostrosti a barvocitu. Oproti LHON je progrese onemocnění pomalá s rozdílnou prognózou, od prakticky asymptomatického průběhu po rozvoj praktické slepoty [97].

Terapie

Terapeutické možnosti LHON jsou stále relativně omezeny. V současné době neexistuje léčba, která by dokázala předejít manifestaci onemocnění či plně navrátit zrakové funkce. V chronickém stadiu onemocnění je pro pacienty stěžejní terapie symptomatická či podpůrná za použití speciálních optických (např. lupy či monokuláry) a elektronických

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017



Obr. 6. Schéma znázorňující propojení jednotlivých pracovišť VFN v Praze a 1. LF UK, která se podílejí na péči o pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku. Centrum pro pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku je zapojením Oční kliniky součástí Evropské referenční sítě pro vzácná onemocnění oka (ERN-EYE).

BAEP – kmenové sluchové evokované potenciály, EMG – elektromyografie , DOA – dominantní atofie optiku, LHON – Leberova hereditární neuropatie optiku , mtDNA – mitochondriální DNA, NGS – sekvenování nové generace, PSG – polysomnografie, WES – celoexomové sekvenování, VEP – vizuální evokované potenciály.

Fig. 6. Schematic representation of General University Hospital and First Faculty of Medicine at Charles University with its interconnected departments involved in the care of patients with mitochondrial optic neuropathies. The Centre for Patients with Mitochondrial Optic neuropathies is a member of European Reference Network for rare eye diseases (ERN-EYE).

BAEP – brainstem auditory evoked potentials, EMG – electromyography, DOA – dominant optic atrophy, LHON – Leber hereditary optic neuropathy, mtDNA – mitochondrial DNA, NGS – next generation sequencing, PSG – polysomnography, WES – whole exome sequencing, VEP – visual evoked potential.

zvětšovacích (kamerové lupy) kompenzačních pomůcek. Nositelé patogenních mutací by se měli přísně vyvarovat kouření (i pasivnímu), nadměrné konzumaci alkoholu a výše zmíněné medikaci s mitochondriální toxicitou [23,37]. U pacientů s extraokulární manifestací je nutná dispenzarizace na specializovaných kardiologických a neurologických pracovištích.

Do nedávné doby byl jedinou terapeutickou možností koenzym Q_{10}, který prostřednictvím sukcinátdehydrogenázy (mitochondriální komplex II) obchází nefunkční komplex I, a zvyšuje tak produkci ATP systémem oxidativní fosforylace. Tato látka je však silně lipofilní a při perorálním podávání je jeho průnik do mitochondrie velmi diskutabilní [98]. Jeho účinnost nebyla nikdy prokázána v klinické studii.

V posledních letech bylo provedeno několik studií testujících nové léčebné přípravky s předpokládaným pozitivním vlivem na stabilizaci a návrat zrakových funkcí. Slibná jsou především analoga ubichinonu s krátkým postranním řetězcem, jakými jsou idebenone a α-tokotrienolchinon (EPI-743), která nahrazují funkci dysfunkčního komplexu I a snižují produkci ROS [99]. Idebenone navíc prokazatelně reaktivuje inaktivní, ale stále životaschopné RGB, čímž umožňuje návrat zrakových funkcí i více než rok po vzniku onemocnění [100].

V randomizované dvojitě placebem zaslepené studii RHODOS (Rescue of Hereditary Optic Disease Outpatient Study), ve které bylo zhodnoceno 82 pacientů s mutací m.11778G>A, došlo při podávání perorálního idebenone per os v dávce 900 mg/den k prokazatelnému zlepšení nejlepší korigované zrakové ostrosti, barvocitu a návratu zrakových funkcí [101]. Po 24 týdnech se zlepšila zraková ostrost především u podskupiny pacientů s dominantním postižením jednoho oka (n = 30). Ve 24. týdnu studie vedla terapie idebenonem ke zlepšení logMAR o ≥ 0,2 u 55 % pacientů, oproti 10 % pacientů v placebo skupině. Žádnému z pacientů léčených idebenonem se zrakové funkce nezhoršily do pásma praktické slepoty [101]. V současnosti je idebenone jedinou oficiálně schválenou léčbou LHON v České republice. Léčba přípravkem EPI-743 je zatím ve fázi klinických zkoušek (IIa) [102]. Pilotní studie s 5 pacienty s LHON užívajícími EPI-743 prokázala stabilizaci onemocnění

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

a návrat zrakových funkcí ve čtyřech případech, přičemž u dvou jedinců byl návrat zrakových funkcí kompletní [102].

V září 2015 obdržela firma GenSight Biologics povolení zahájit fázi III. klinických zkoušek genové terapie GS010 pro pacienty s LHON nesoucími mutaci m.11778G>A [103]. Terapie je založena na jednorázové intravitreální injekci rekombinantního adeno-asociovaného viru 2 nesoucího gen kódující ND4 podjednotku komplexu I (rAAV2-ND4). První studie Wan et al ukázala významné zlepšení zrakové ostrosti a nálezu na perimetru na očích 9 pacientů, avšak tloušťka RNFL a prodloužená odezva na VEP se nezměnila [104]. K vyhodnocení účinnosti této nadějné léčby je třeba vyčkat na výsledky dlouhodobé, multicentrické, randomizované studie.

Na experimentální úrovni je studována celá řada dalších látek. Jednu skupinu tvoří aktivátory mitochondriální biogeneze (resveratrol, bezafibrát, rosiglitazon a 5-aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleosid neboli AICAR), které by mohly zvyšovat kompenzační potenciál symptomatických pacientů [105]. Nadějně se jeví i ovlivnění estrogenových receptorů pomocí fytoestrogenů. Stimulace ER-β receptorů na myších modelech vedla ke snížení produkce ROS, a tudíž i apoptózy, a podpoře mitochondriální biogeneze [106]. Obdobně měl na myších modelech antiapoptotické a antioxidativní účinky i α2-agonista brimonidin [107]. Přestože u pacientů s izolovaným LHON neměl prokazatelné účinky na zlepšení zrakových funkcí, u pacientů s LHON a současně diagnostikovaným glaukomem, který zhoršuje stázu axoplazmy, se léčba brimonidinem jeví jako racionální [98,108,109].

Centralizace péče o pacienty s LHON a jinými neuropatiemi optiku

Nové možnosti terapie LHON podtrhují nutnost časné diagnózy. Adekvátní léčba bývá bohužel často zahájena pozdě, a nedosahuje tak požadovaných výsledků. Z výše uvedených důvodů vzniklo ve VFN v Praze specializované Centrum pro pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku za účelem optimalizace diagnostických a terapeutických algoritmů a studia rizikových faktorů rozvoje mitochondriálních onemocnění postihujících také zrakový nerv. V roce 2016 byla Oční klinika 1. LF UK a VFN v Praze zapojena do Evropské referenční sítě pro diagnostiku vzácných onemocnění oka (ERN-EYE) a právě Centrum pro pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku je i v mezinárodním kontextu její významnou součástí (obr. 6). Hlavním cílem této evropské iniciativy je posílení postavení pacientů a podpora vysoce kvalitní, komplexní a nákladově efektivní zdravotní péče pro pacienty s vzácnými chorobami, a to zejména prostřednictvím úzké spolupráce specializovaných zdravotnických zařízení v rámci celé Evropské unie.

V průběhu dvou let bylo v Centru pro pacienty s mitochondriálními neuropatiemi optiku podrobně vyšetřeno celkem 54 jedinců (20 symptomatických) s LHON, 5 symptomatických pacientů s DOA [110] a 10 pacientů s neuropatií optiku se zatím neobjasněnou příčinou. U 2 pacientů s neznámou příčinou atrofie se podařilo odhalit kauzální mutace v podjednotkách komplexu I [39]. Díky včasné diagnóze stanovené v našem centru bylo u 9 pacientů s LHON možno zahájit terapii idebenonem v období od 4 týdnů do 9 měsíců po vzniku ztráty zraku. Dva pacienty se podařilo zařadit do fáze III. klinických zkoušek genové terapie v Nemocnici Mnichov-Schwabing (RESCUE Study, GenSight Biologics, Paris; číslo studie: GS-LHON-CLIN-03A) a jsou tak vůbec prvními pacienty léčenými genovou terapií v České republice.

Závěr

LHON je maternálně dědičné onemocnění projevující se rychlou, nebolestivou ztrátou zraku. Zcela nedávno bylo prokázáno, že včasné zahájení terapie idebenonem může vést k významnému zlepšení zrakových funkcí u pacientů s manifestací tohoto onemocnění. Vzhledem k tomu, že LHON bývá často nesprávně vyhodnocen a následně i léčen jako RS, od které je v akutní fázi prakticky neodlišitelný, měl by být zavzat do diferenciálně diagnostické rozvahy u každé progresivně se rozvíjející neuropatie optiku.

Literatura

1. Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, et al. The epidemiology of mitochondrial disorders – past, present and future. Biochim Biophys Acta 2004;1659(2–3):115–20.

2. Leber T. About hereditary and congenital optic neuropathy. Albrecht Von Grafes Arch Ophthalmol 1871;17:249–91.

3. Wallace DC. A new manifestation of Leber's disease and a new explanation for the agency responsible for its unusual pattern of inheritance. Brain 1970;93(1):121–32.

4. Wallace DC, Singh G, Lott MT, et al. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Science 1988;242(4884):1427–30.

5. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. Prog Retin Eye Res 2004;23(1):53–89.

6. Yu-Wai-Man P, Turnbull DM, Chinnery PF. Leber hereditary optic neuropathy. J Med Genet 2002;39(3):162–9.

7. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Brown DT, et al. The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. Am J Hum Genet 2003;72(2):333–9.

8. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. Ann Neurol 2015;77(5):753–9. doi: 10.1002/ana.24362.

9. Spruijt L, Kolbach DN, de Coo RF, et al. Influence of mutation type on clinical expression of Leber hereditary optic neuropathy. Am J Ophthalmol 2006;141(4):676–82.

10. Puomila A, Hamalainen P, Kivioja S, et al. Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. Eur J Hum Genet 2007;15(10):1079–89.

11. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF. Leber Hereditary Optic Neuropathy. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. eds. Seattle: Seattle University of Washington 1993.

12. Nikoskelainen EK, Huoponen K, Juvonen V, et al. Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. Ophthalmology 1996;103(3):504–14.

13. Riordan-Eva P, Sanders MD, Govan GG, et al. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. Brain 1995; 118(Pt 2):319–37.

14. Dimitriadis K, Leonhardt M, Yu-Wai-Man P, et al. Leber's hereditary optic neuropathy with late disease onset: clinical and molecular characteristics of 20 patients. Orphanet J Rare Dis 2014;9:158. doi: 10.1186/s13023-014-0158-9.

15. Barboni P, Carbonelli M, Savini G, et al. Natural history of Leber's hereditary optic neuropathy: longitudinal analysis of the retinal nerve fiber layer by optical coherence tomography. Ophthalmology 2010;117(3):623–27. doi: 10.1016/j.ophtha.2009.07.026.

16. Wakakura M, Yokoe J. Evidence for preserved direct pupillary light response in Leber's hereditary optic neuropathy. Br J Ophthalmol 1995;79(5):442–6.

17. Kawasaki A, Herbst K, Sander B, et al. Selective wavelength pupillometry in Leber hereditary optic neuropathy. Clin Exp Ophthalmol 2010;38(3):322–4. doi: 10.1111/j.1442-9071.2010.02212.x.

18. Ziccardi L, Sadun F, De Negri AM, et al. Retinal function and neural conduction along the visual pathways in affected and unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2013;54(10):6893–901. doi: 10.1167/iovs.13-12894.

19. Nikoskelainen E, Sogg RL, Rosenthal AR, et al. The early phase in Leber hereditary optic atrophy. Arch Ophthalmol 1977;95(6):969–78.

20. Harding AE, Sweeney MG, Govan GG, et al. Pedigree analysis in Leber hereditary optic neuropathy families with a pathogenic mtDNA mutation. Am J Hum Genet 1995;57(1):77–86.

21. Barboni P, Savini G, Valentino ML, et al. Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in Leber's hereditary optic neuropathy. Ophthalmology 2005;112(1):120–6.

22. Balducci N, Savini G, Cascavilla ML, et al. Macular nerve fibre and ganglion cell layer changes in acute Leber's hereditary optic neuropathy. Br J Ophthalmol 2016;100(9):1232–7. doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-307326.

23. Kirkman MA, Yu-Wai-Man P, Korsten A, et al. Gene-environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. Brain 2009;132(Pt 9):2317–26. doi: 10.1093/brain/awp158.

24. Barboni P, Savini G, Valentino ML, et al. Leber's hereditary optic neuropathy with childhood onset. Invest Ophthalmol Vis Sci 2006;47(12):5303–9. doi: 10.1167/iovs.06-0520.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

25. Ramos Cdo V, Bellusci C, Savini G, et al. Association of optic disc size with development and prognosis of Leber's hereditary optic neuropathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2009;50(4):1666–74. doi: 10.1167/iovs.08-2695.
26. Riordan-Eva P, Harding AE. Leber's hereditary optic neuropathy: the clinical relevance of different mitochondrial DNA mutations. J Med Genet 1995;32(2):81–7.
27. Johns DR, Heher KL, Miller NR, et al. Leber's hereditary optic neuropathy. Clinical manifestations of the 14484 mutation. Arch Ophthalmol 1993;111(4):495–8.
28. Macmillan C, Kirkham T, Fu K, et al. Pedigree analysis of French Canadian families with T14484C Leber's hereditary optic neuropathy. Neurology 1998;50(2):417–22.
29. Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. Biochem Biophys Res Commun 1992;187(3):1551–7.
30. Lam BL, Feuer WJ, Schiffman JC, et al. Trial end points and natural history in patients with G11778A Leber hereditary optic neuropathy : preparation for gene therapy clinical trial. JAMA Ophthalmology 2014;132(4):428–36. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.7971.
31. Newman NJ, Lott MT, Wallace DC. The clinical characteristics of pedigrees of Leber's hereditary optic neuropathy with the 11778 mutation. Am J Ophthalmol 1991;111(6):750–62.
32. Sadun AA, Salomao SR, Berezovsky A, et al. Subclinical carriers and conversions in Leber hereditary optic neuropathy: a prospective psychophysical study. Trans Am Ophthalmol Soc 2006;104:751–61.
33. Barboni P, Savini G, Valentino ML, et al. Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy mutations. Ophthalmology 2005;112(1):127–31.
34. Salomao SR, Berezovsky A, Andrade RE, et al. Visual electrophysiologic findings in patients from an extensive Brazilian family with Leber's hereditary optic neuropathy. Doc Ophthalmol 2004;108(2):147–55.
35. Sacai PY, Salomao SR, Carelli V, et al. Visual evoked potentials findings in non-affected subjects from a large Brazilian pedigree of 11778 Leber's hereditary optic neuropathy. Doc Ophthalmol 2010;121(2):147–54. doi: 10.1007/s10633-010-9241-2.
36. Livingstone IR, Mastaglia FL, Howe JW, et al. Leber's optic neuropathy: clinical and visual evoked response studies in asymptomatic and symptomatic members of a 4-generation family. Br J Ophthalmol 1980;64(10):751–7.
37. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Chinnery PF. Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies. Prog Retin Eye Res 2011;30(2):81–114. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.11.002.
38. Blakely EL, de Silva R, King A, et al. LHON/MELAS overlap syndrome associated with a mitochondrial MTND1 gene mutation. Eur J Hum Genet 2005;13(5):623–7.
39. Kolarova H, Liskova P, Tesarova M et al. Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5. Ophthalmic Genet 2016;37(4):419–23.
40. Howell N, Kubacka I, Xu M, et al. Leber hereditary optic neuropathy: involvement of the mitochondrial ND1 gene and evidence for an intragenic suppressor mutation. Am J Hum Genet 1991;48(5):935–42.
41. De Vries DD, Went LN, Bruyn GW, et al. Genetic and biochemical impairment of mitochondrial complex I activity in a family with Leber hereditary optic neuropathy and hereditary spastic dystonia. Am J Hum Genet 1996;58(4):703–11.
42. Jun AS, Brown MD, Wallace DC. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91(13):6206–10.
43. Gropman A, Chen TJ, Perng CL, et al. Variable clinical manifestation of homoplasmic G14459A mitochondrial DNA mutation. Am J Med Genet A 2004;124A(4):377–82.
44. Tarnopolsky MA, Baker SK, Myint T, et al. Clinical variability in maternally inherited leber hereditary optic neuropathy with the G14459A mutation. Am J Med Genet A 2004;124A(4):372–6. doi: 10.1002/ajmg.a.20449.
45. Newman NJ. Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. Arch Neurol 1993;50(5):540–8.
46. Harding AE, Sweeney MG, Miller DH, et al. Occurrence of a multiple sclerosis-like illness in women who have a Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. Brain 1992;115(Pt 4):979–89.
47. Dotti MT, Caputo N, Signorini E, et al. Magnetic resonance imaging findings in Leber's hereditary optic neuropathy. Eur Neurol 1992;32(1):17–9.
48. Mashima Y, Oshitari K, Imamura Y, et al. Orbital high resolution magnetic resonance imaging with fast spin echo in the acute stage of Leber's hereditary optic neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1998;64(1):124–7.
49. Kellar-Wood H, Robertson N, Govan GG, et al. Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutations in multiple sclerosis. Ann Neurol 1994;36(1):109–12.
50. Jansen PH, van der Knaap MS, de Coo IF. Leber's hereditary optic neuropathy with the 11,778 mtDNA mutation and white matter disease resembling multiple sclerosis: clinical, MRI and MRS findings. J Neurol Sci 1996;135(2):176–80.
51. Vanopdenbosch L, Dubois B, D'Hooghe MB, et al. Mitochondrial mutations of Leber's hereditary optic neuropathy: a risk factor for multiple sclerosis. J Neurol 2000;247(7):535–43.
52. Pfeffer G, Burke A, Yu-Wai-Man P, et al. Clinical features of MS associated with Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations. Neurology 2013;81(24):2073–81. doi: 10.1212/01.wnl.0000437308.22603.43.
53. Matthews L, Enzinger C, Fazekas F, et al. MRI in Leber's hereditary optic neuropathy: the relationship to multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2015;86(5):537–42. doi: 10.1136/jnnp-2014-308186.
54. Palace J. Multiple sclerosis associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. J Neurol Sci 2009;286(1-2):24–7. doi: 10.1016/j.jns.2009.09.009.
55. Bristow EA, Griffiths PG, Andrews RM, et al. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. Arch Ophthalmol 2002;120(6):791–6.
56. Howell N. Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve. Vision Res 1998;38(10):1495–504.
57. Lowry OH, Roberts NR, Lewis C. The quantitative histochemistry of the retina. J Biol Chem 1956;220(2):879–92.
58. Kageyama GH, Wong-Riley MT. The histochemical localization of cytochrome oxidase in the retina and lateral geniculate nucleus of the ferret, cat, and monkey, with particular reference to retinal mosaics and ON/OFF-center visual channels. J Neurosci 1984;4(10):2445–59.
59. Klivenyi P, Karg E, Rozsa C, et al. Alpha-Tocopherol/lipid ratio in blood is decreased in patients with Leber's hereditary optic neuropathy and asymptomatic carriers of the 11778 mtDNA mutation. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2001;70(3):359–62.
60. Alexander C, Votruba M, Pesch UE, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat Genet 2000;26(2):211–5.
61. Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat Genet 2000;26(2):207–10.
62. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain 2014;137(Pt 2):335–53. doi: 10.1093/brain/awt343.
63. Sadun AA, La Morgia C, Carelli V. Mitochondrial optic neuropathies: our travels from bench to bedside and back again. Clin Exp Ophthalmol 2013;41(7):702–12. doi: 10.1111/ceo.12086.
64. Vidrova V, Tesarova M, Trefilova E, et al. Mitochondrial DNA haplogroups in the Czech population compared to other European countries. Hum Biol 2008;80(6):669–74. doi: 10.3378/1534-6617-80.6.669.
65. Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. Gene 1999;238(1):211–30.
66. Howell N, Kubacka I, Halvorson S, et al. Leber's hereditary optic neuropathy: the etiological role of a mutation in the mitochondrial cytochrome b gene. Genetics 1993;133(1):133–6.
67. Brown MD, Torroni A, Reckord CL, et al. Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. Hum Mutat 1995;6(4):311–25.
68. Vergani L, Martinuzzi A, Carelli V, et al. MtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy: studies on cytoplasmic hybrid (cybrid) cells. Biochem Biophys Res Commun 1995;210(3):880–8.
69. Brown MD, Sun F, Wallace DC. Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. Am J Hum Genet 1997;60(2):381–7.
70. Torroni A, Petrozzi M, D'Urbano L, et al. Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. Am J Hum Genet 1997;60(5):1107–21.
71. Torroni A, Wallace DC. Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. J Bioenerg Biomembr 1994;26(3):261–71.
72. Smith KH, Johns DR, Heher KL, et al. Heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. Arch Ophthalmol 1993;111(11):1486–90.
73. Chinnery PF, Andrews RM, Turnbull DM, et al. Leber hereditary optic neuropathy: Does heteroplasmy influence the inheritance and expression of the G11778A mitochondrial DNA mutation? Am J Med Genet 2001;98(3):235–43.
74. Black GC, Morten K, Laborde A, et al. Leber's hereditary optic neuropathy: heteroplasmy is likely to be significant in the expression of LHON in families with the 3460 ND1 mutation. Br J Ophthalmol 1996;80(10):915–7.
75. Jacobi FK, Leo-Kottler B, Mittelviefhaus K, et al. Segregation patterns and heteroplasmy prevalence in Leber's hereditary optic neuropathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 2001;42(6):1208–14.
76. Howell N, Xu M, Halvorson S, et al. A heteroplasmic LHON family: tissue distribution and transmission of the 11778 mutation. Am J Hum Genet 1994;55(1):203–6.
77. Weber K, Wilson JN, Taylor L, et al. A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. Am J Hum Genet 1997;60(2):373–80.
78. Howell N, Ghosh SS, Fahy E, et al. Longitudinal analysis of the segregation of mtDNA mutations in heteroplasmic individuals. J Neurol Sci 2000;172(1):1–6.
79. Bu XD, Rotter JI. X chromosome-linked and mitochondrial gene control of Leber hereditary optic neuropathy: evidence from segregation analysis for dependence on X chromosome inactivation. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88(18):8198–202.
80. Nakamura M, Fujiwara Y, Yamamoto M. The two locus control of Leber hereditary optic neuropathy and a high penetrance in Japanese pedigrees. Hum Genet 1993;91(4):339–41.
81. Carvalho MR, Muller B, Rotzer E, et al. Leber's hereditary optic neuroretinopathy and the X-chromosomal susceptibility factor: no linkage to DXs7. Hum Hered 1992;42(5):316–20.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

www.csnn.eu | stazeno: 29.10.2017

82. Chen JD, Cox I, Denton MJ. Preliminary exclusion of an X-linked gene in Leber optic atrophy by linkage analysis. Hum Genet 1989;82(3):203–7.
83. Sweeney MG, Davis MB, Lashwood A, et al. Evidence against an X-linked locus close to DXS7 determining visual loss susceptibility in British and Italian families with Leber hereditary optic neuropathy. Am J Hum Genet 1992;51(4):741–8.
84. Handoko HY, Wirapati PJ, Sudoyo HA, et al. Meiotic breakpoint mapping of a proposed X linked visual loss susceptibility locus in Leber's hereditary optic neuropathy. J Med Genet 1998;35(8):668–71.
85. Giordano C, Montopoli M, Perli E, et al. Oestrogens ameliorate mitochondrial dysfunction in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain 2011;134(Pt 1):220–34. doi: 10.1093/brain/awq276.
86. Pott JW, Wong KH. Leber's hereditary optic neuropathy and vitamin B12 deficiency. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2006;244(10):1357–9.
87. Jalil A, Usmani HA, Khan MI, et al. Bilateral paediatric optic neuropathy precipitated by vitamin B12 deficiency and a novel mitochondrial DNA mutation. Int Ophthalmol 2013;33(6):687–90. doi: 10.1007/s10792-013-9773-z.
88. Saini M, Khurana D. Chronic relapsing inflammatory optic neuropathy. Ann Indian Acad Neurol 2010;13(1):61–3. doi: 10.4103/0972-2327.61280.
89. Scolding N. The differential diagnosis of multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2001;71(Suppl 2):ii9–15.
90. Kidd D, Burton B, Plant GT, et al. Chronic relapsing inflammatory optic neuropathy (CRION). Brain 2003;126(Pt 2):276–84.
91. Germann CA, Baumann MR, Hamzavi S. Ophthalmic diagnoses in the ED: optic neuritis. Am J Emerg Med 2007;25(7):834–7.
92. Igarashi Y, Oyachi H, Nakamura Y, et al. Neuromyelitis optica. Ophthalmologica 1994;208(4):226–9.
93. Arnold TW, Myers GJ. Neuromyelitis optica (Devic syndrome) in a 12-year-old male with complete recovery following steroids. Pediatr Neurol 1987;3(5):313–5.
94. Hinson SR, Pittock SJ, Lucchinetti CF, et al. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. Neurology 2007;69(24):2221–31.
95. Saadoun S, Waters P, Bell BA, et al. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica immunoglobulin G and human complement produces neuromyelitis optica lesions in mice. Brain 2010;133(Pt 2):349–61. doi: 10.1093/brain/awp309.
96. Waters P, Vincent A. Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays. Int MS J 2008;15(3):99–105.
97. Votruba M, Moore AT, Bhattacharya SS. Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. J Med Genet 1998;35(10):793–800.
98. Meyerson C, Van Stavern G, McClelland C. Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. Clin Ophthalmol 2015;9:1165–76. doi: 10.2147/opth.s62021.
99. Geromel V, Darin N, Chretien D, et al. Coenzyme Q(10) and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits. Mol Genet Metab 2002;77(1–2):21–30.
100. Lyseng-Williamson KA. Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Drugs 2016;76(7):805–13. doi: 10.1007/s40265-016-0574-3.
101. Klopstock T, Yu-Wai-Man P, Dimitriadis K, et al. A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. Brain 2011;134(Pt 9):2677–86. doi: 10.1093/brain/awr170.
102. Sadun AA, Chicani CF, Ross-Cisneros FN, et al. Effect of EPI-743 on the clinical course of the mitochondrial disease Leber hereditary optic neuropathy. Arch Neurol 2012;69(3):331–8. doi: 10.1001/archneurol.2011.2972.
103. GenSight. GenSight Biologics Receives IND Acceptance from FDA to Enter Phase III with GS010. Paris, France; 2015.
104. Wan X, Pei H, Zhao MJ, et al. Efficacy and Safety of rAAV2-ND4 Treatment for Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Sci Rep 2016;6:21587. doi: 10.1038/srep21587.
105. La Morgia C, Carbonelli M, Barboni P, et al. Medical management of hereditary optic neuropathies. Front Neurol 2014;5:141. doi: 10.3389/fneur.2014.00141.
106. Pisano A, Preziuso C, Iommarini L, et al. Targeting estrogen receptor beta as preventive therapeutic strategy for Leber's hereditary optic neuropathy. Hum Mol Genet 2015;24(24):6921–31. doi: 10.1093/hmg/ddv396.
107. Saylor M, McLoon LK, Harrison AR, et al. Experimental and clinical evidence for brimonidine as an optic nerve and retinal neuroprotective agent: an evidence-based review. Arch Ophthalmol 2009;127(4):402–6. doi: 10.1001/archophthalmol.2009.9.
108. Newman NJ, Biousse V, David R, et al. Prophylaxis for second eye involvement in leber hereditary optic neuropathy: an open-labeled, nonrandomized multicenter trial of topical brimonidine purite. Am J Ophthalmol 2005;140(3):407–15. doi: 10.1016/j.ajo.2005.03.058.
109. Thouin A, Griffiths PG, Hudson G, et al. Raised intraocular pressure as a potential risk factor for visual loss in Leber Hereditary Optic Neuropathy. PLoS One 2013;8(5):e63446. doi: 10.1371/journal.pone.0063446.
110. Liskova P, Tesarova M, Dudakova L, et al. OPA1 analysis in an international series of probands with bilateral optic atrophy. Acta Ophthalmol 2017;95(4):363–9. doi: 10.1111/aos.13285.
111. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, et al. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. N Engl J Med 1989;320(20):1293–9.
112. Nikoskelainen EK. Clinical picture of LHON. Clin Neurosci 1994;2:115–20.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.csnn.eu/prohlaseni

Supplement 11]

Dudakova, L., Kousal, B., ***Kolarova, H.****, Hlavata, L., Liskova, P.*

Genová terapie dědičných onemocnění sítnice a zrakového nervu: Současný stav poznání. Gene therapy for inherited retinal and optic nerve disorders: Current knowledge.

Čes a Slov Oftal 2016 72 (4), 128-136.

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

GENOVÁ TERAPIE DĚDIČNÝCH ONEMOCNĚNÍ SÍTNICE A ZRAKOVÉHO NERVU: SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

Ďuďáková Ľ.[1*], Kousal B.[1,2*], Kolářová H.[1], Hlavatá L.[1,3], Lišková P.[1,2]

[1]Ústav dědičných metabolických poruch, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha, přednosta prof. MUDr. Viktor Kožich, CSc.
[2]Oční klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha, přednostka doc. MUDr. Jarmila Heissigerová, Ph.D., MBA
[3]Oční klinika JL, s.r.o., primář doc. MUDr. Ján Lešťák, CSc., FEBO, MBA, LL.A, DBA, FAOG

**** Autoři přispěli k práci stejným podílem***

Autoři práce prohlašují, že vznik i téma odborného sdělení a jeho zveřejnění není ve střetu zájmu a není podpořeno žádnou farmaceutickou firmou.

Do redakce doručeno dne 5. 2. 2016
Do tisku přijato dne 26. 7. 2016

Doc. MUDr. P. Lišková, M.D., Ph.D.
Ústav dědičných metabolických poruch a Oční klinika
1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze
Ke Karlovu 2
128 00 Praha 2
petra.liskova@lf1.cuni.cz
http://ocnigenetika.lf1.cuni.cz

SOUHRN

Cíl: Práce poskytuje souhrn výsledků probíhajících klinických studií, které testují genové terapie monogenně dědičných onemocnění sítnice a zrakového nervu.
Metody: Literární rešerše zaměřená na principy, doporučené postupy, aplikaci a výsledky genových terapií u primárně sítnicových onemocnění a onemocnění zrakového nervu.
Výsledky: V současné době probíhají v zahraničních centrech klinické zkoušky testující genové terapie pro Leberovu kongenitální amaurózu typu 2 (LCA2), retinitis pigmentosa typu 38, Usherův syndrom typu 1B, Stargardtovu chorobu, chorioideremii, achromatopsii, Leberovu hereditární neuropatii optiku (LHON) a X-vázanou retinoschízu. Až na terapie vnášející gen *RPE65* (LCA2) a *MT-ND4* (LHON), které již pokročily do fáze III, jsou všechna klinická hodnocení ve fázích I a II, v nichž se testuje bezpečnost a zjišťuje se účinná dávka léku.
Závěr: V současné době se vývoj genové terapie zaměřuje na celou řadu nových onemocnění. Sítnice je pro svoji dostupnost z hlediska aplikace a kontroly účinků neobyčejně vhodnou tkání pro tento druh léčby. S rozvojem nových terapeutických postupů stoupá význam znalosti molekulárně genetické příčiny onemocnění, která je i podmínkou zařazení do klinických studií testujících cílené, především genové terapie.
Klíčová slova: genová terapie, monogenní onemocnění sítnice, atrofie optického nervu, mitochondriální onemocnění

SUMMARY

GENE THERAPY FOR INHERITED RETINAL AND OPTIC NERVE DISORDERS: CURRENT KNOWLEDGE

The aim of this review is to provide a comprehensive summary of current gene therapy clinical trials for monogenic and optic nerve disorders.
The number of genes for which gene-based therapies are being developed is growing. At the time of writing this review gene-based clinical trials have been registered for Leber congenital amaurosis 2 (LCA2), retinitis pigmentosa 38, Usher syndrome 1B, Stargardt disease, choroideremia, achromatopsia, Leber hereditary optic neuropathy (LHON) and X-linked retinoschisis. Apart from *RPE65* gene therapy for LCA2 and *MT-ND4* for LHON which has reached phase III, all other trials are in investigation phase I and II, i.e. testing the efficacy and safety.
Because of the relatively easy accessibility of the retina and its ease of visualization which allows monitoring of efficacy, gene-based therapies for inherited retinal disorders represent a very promising treatment option. With the development of novel therapeutic approaches, the importance of establishing not only clinical but also molecular genetic diagnosis is obvious.
Key words: gene therapy, monogenic retinal diseases, optic nerve atrophy, mitochondrial disease

Čes. a slov. Oftal., 72, 2016, No. 4, p. 128–136

ÚVOD

Dědičná onemocnění sítnice jsou jednou z nejčastějších příčin závažné ztráty zraku v dětském věku a časné dospělosti (49). Terapeutické možnosti jsou v běžné klinické praxi omezeny na léčbu některých doprovodných příznaků, ovšem bez možnosti ovlivnění degenerativních procesů v samotných fotoreceptorech. Genové terapie představují v léčbě této skupiny chorob zcela nový přístup. Jsou zaměřeny na přenos plně funkční kopie genu s cílem nahradit sníženou či nulovou funkci proteinu, který je kódován mutovaným genem, a/nebo na regeneraci či stabilizaci narušené retinální struktury (40). Oko je vzhledem ke snadné dostupnosti, malým rozměrům, imunologickému privilegiu, kompartmentalizaci a možnosti kontralaterální kontroly ideální cílovým orgánem pro genové terapie (37).

CÍL

Cílem naší práce bylo podat souhrnný přehled o probíhajících klinických zkouškách testujících genové terapie hereditárních onemocnění sítnice a zrakového nervu.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

METODY

Literární rešerše zaměřená na principy, doporučené postupy, aplikaci a výsledky genových terapií pro monogenní hereditární onemocnění sítnice a zrakového nervu ve stadiu klinických zkoušek. Zdrojem informací o probíhajících klinických studiích byl mezinárodní registr klinických studií „https://clinicaltrials.gov".

VÝSLEDKY

Základní předpoklady pro aplikaci genové terapie

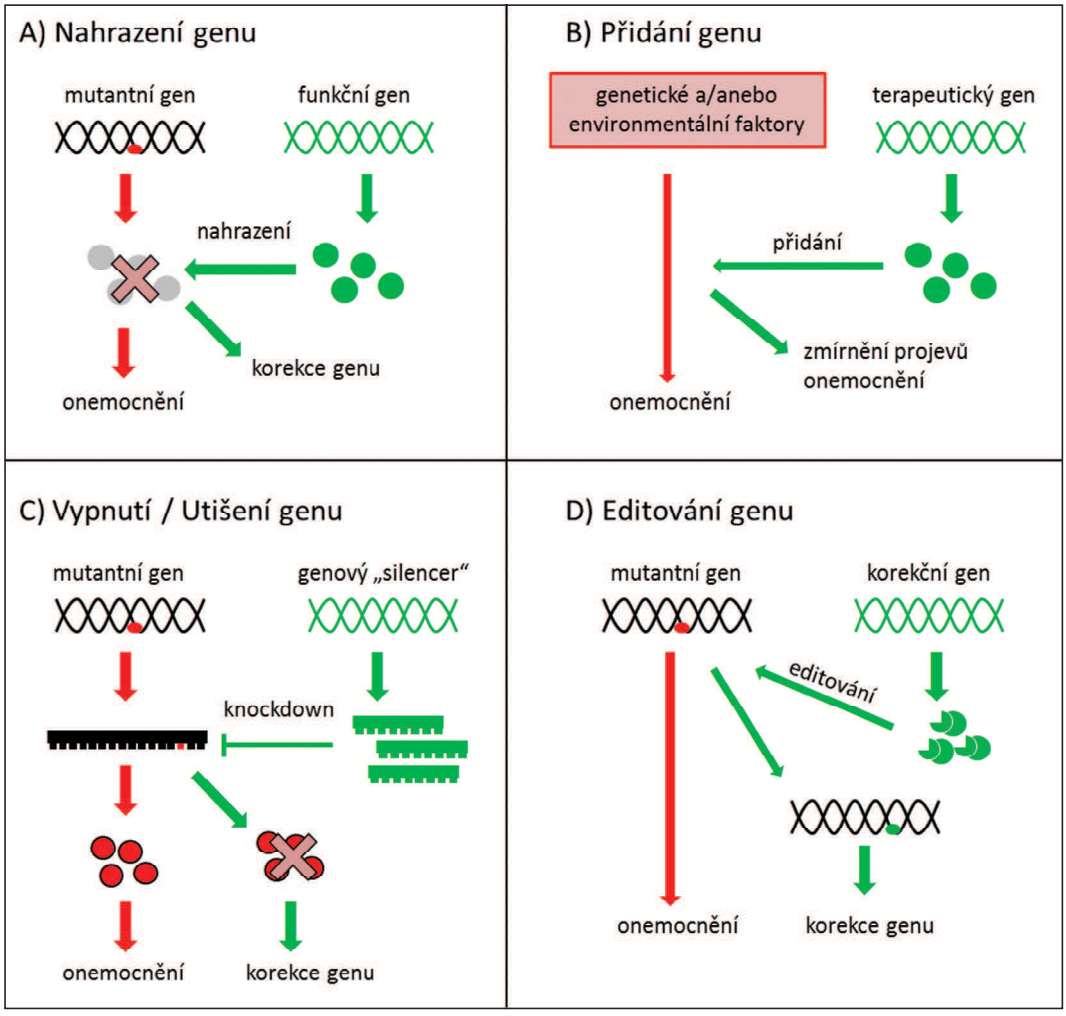
Genová terapie je léčebný postup, při němž je do genomu buněk vnesen genetický materiál, který nahrazuje nebo ovlivňuje expresi proteinu účastnícího se patogeneze konkrétního onemocnění. Ačkoliv tato léčba byla již v minulosti úspěšně použita např. u závažných imunodeficitů (42), stále se jedná pouze o terapii experimentální, jež s sebou může nést řadu nežádoucích účinků.

K vývoji a aplikaci genové terapie je třeba znát příčinu geneticky podmíněné choroby na molekulární úrovni, tedy určit gen odpovědný za vznik onemocnění. Shromážděné poznatky o genetických příčinách monogenních onemocnění jsou vkládány do databáze OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), která je přístupná na adrese „http://www.omim.org" a v současnosti obsahuje přes 5 000 záznamů. Dalším krokem je určení konkrétní mutace způsobující patologický proces u daného pacienta. V rámci vývoje se hodnotí, zda po aplikaci genové terapie dojde k vymizení nebo zmírnění projevů onemocnění. Zároveň léčba nesmí mít negativní dopady na životně důležité funkce organismu.

Strategie genové terapie se stanovuje s ohledem na výše uvedené požadavky. Pokud je příčinou onemocnění nedostatek produktu mutovaného genu, stačí začlenit normální (tzv. wild type) sekvenci genu do genomu příslušných buněk (obr. 1A) nebo vnesením terapeutického genu zmírnit projevy onemocnění (obr. 1B). Pokud však patologicky působí pozměněný produkt mutovaného genu charakteru aberantního proteinu, je nutné mutovaný gen buď zablokovat (obr. 1C), nebo ho opravit (obr. 1D) (56).

Genovou terapii lze provádět *in vivo,* kdy jsou cílové buňky po celou dobu léčby součástí organismu, nebo *in vitro*, kdy jsou cílové buňky z těla organismu odebrány a po provedení léčby vráceny na původní místo (25).

Zařazování pacientů do klinických studií je vždy podmíněno řadou kritérií. Vzhledem k samotné podstatě geneticky podmíněných onemocnění bývá standardním postupem a zároveň i prvním krokem zjištění příčiny onemocnění na



Obr. 1 Strategie využívané při genové terapii (56)

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

Tab. 1 Virové vektory používané pro genové terapie a jejich vlastnosti (53)

	Retrovirus	Lentivirus	Adenovirus	Adeno-asociovaný virus
Genetický materiál	RNA	RNA	dsDNA	ssDNA
Velikost genomu	7–11 kb	8 kb	36 kb	4,7 kb
Klonovací kapacita	8 kb	8 kb	7–35 kb	< 5 kb
Forma intergrace	Stabilní	Stabilní	Epizomální*	Stabilní/epizomální
Cílové buňky	Jen dělící se	Dělící se i nedělící se	Dělící se i nedělící se	Dělící se i nedělící se, nevhodný pro hematopoetické
Exprese virových proteinů	Ne	Ano/Ne (dle typu vektoru)	Ano/Ne (dle typu vektoru)	Ne
Exprese transgenu	Pomalá, konstitutivní	Pomalá, konstitutivní	Rychlá, přechodná	Průměrná, konstitutivní, přechodná
Metoda transformace	*Ex vivo*	*Ex vivo*	*Ex/in vivo*	*Ex/in vivo*
Preexistující protilátky proti vektorům	Nepravděpodobné	Pravděpodobné	Ano	Ano
Imunogennost	Nízká	Nízká	Vysoká	Průměrná
Potenciální imunogenicita virového nosiče	Nízká	Vysoká	Nízká	Žádná
Potenciální rizika	Inzerční mutageneze	Inzerční mutageneze	Potenciálně zánětlivá reakce	Krátkodobě žádné, dlouhodobě není známo

* *epizomální* - reverzibilní integrace do genomové DNA hostitele

molekulárně genetické úrovni. Rozdílné genetické pozadí spolu s možnou přítomností preexistujících protilátek proti virovým vektorům jsou příčinou variability výstupních klinických parametrů po aplikaci genové terapie u jednotlivých pacientů. Vysoká hladina specifických neutralizujících protilátek je jedním z kritérií vylučujících zařazení do studií (30). Mezi současné nevýhody genové terapie sítnicových onemocnění patří vysoká finanční a technologická náročnost, stejně tak i nutnost aplikovat léčbu v tzv. terapeutickém okénku, kdy ještě nedošlo k nevratnému poškození tkáně (5).

Vektory používané pro genovou terapii

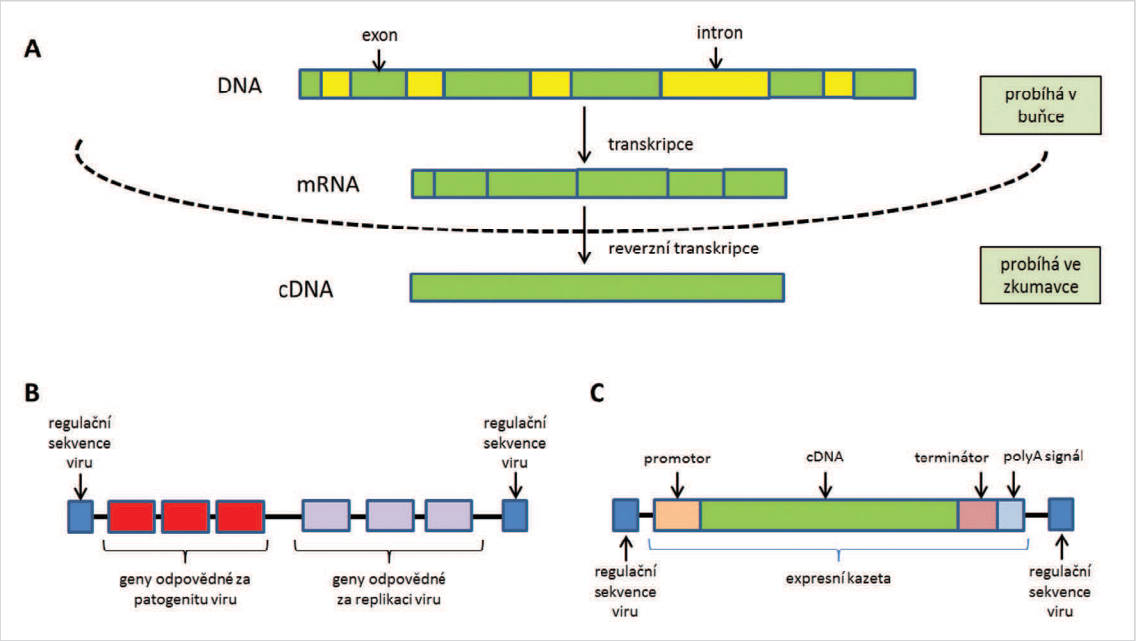
Genetická informace se přenáší do cílových buněk pomocí nosičů zvaných vektory. Buňka, do které byl gen vnesen a zároveň v ní probíhá i jeho funkční exprese (vyjádření genetické informace), se označuje jako buňka transdukovaná. Ideální vektor by měl pronikat do velkého počtu cílových buněk a exprese vneseného genu v transdukované buňce by měla probíhat po dostatečně dlouhou dobu, aby bylo dosaženo požadovaného terapeutického účinku. Vektor navíc nesmí být pro cílové buňky toxický či vyvolávat u příjemce nežádoucí účinky, jakými jsou virové infekce či autoimunitní reakce (36). Vektory dělíme na virové a nevirové. Pro řadu nevýhod fyzikálních a chemických vektorů se v současné době v klinických zkouškách, které testují terapie pro onemocnění sítnice u lidí, využívá vektorů virových (tab. 1), zejména adenovirových a retrovirových (36).

Z virových částic jsou odstraněny geny, které souvisí s patogenitou a množením virových částic. Tyto jsou pak nahrazeny expresní kazetou (obr. 2). Připravena je z DNA přepsané do mRNA procesem transkripce, ve které jsou již vystřiženy nekódující sekvence (introny) a ta je zpětně přepsána do cDNA, která obsahuje jen kódující sekvence genu (exony). cDNA je ohraničena na 5´-konci promotorem, který spouští expresi genu, a na 3´-konci terminátorem transkripce a polyadenylačním signálem, které expresi ukončují (26).

Riziko použití virových vektorů spočívá v tom, že genetická informace je do genomu příjemce vkládána víceméně náhodně. Tím může dojít k narušení sekvence jiného genu s funkčními následky, např. změna v protoonkogenu nebo v tumor-supresorovém genu může spustit maligní transformaci buňky. Dalším problémem je nestabilní exprese genu způsobená potenciální imunogenicitou virových vektorů způsobující zánětlivé reakce (40). Další aplikace virového vektoru již nemusí být dostatečně účinná, jelikož proti vektoru jsou vytvořeny protilátky (7). Opakovaná aplikace terapeutika do subretinální oblasti také nese riziko poškození nebo odchlípení sítnice (obr. 3, tab. 2) (8). Problematické je rovněž stanovení terapeutické dávky a množství aplikovaných virových částic. V počátcích genové terapie způsobily vysoké dávky virových vektorů při léčbě deficitu ornitin transkarbamylázy masivní zánětlivou odpověď a úmrtí pacienta (48). Poté došlo ke zpřísnění podmínek pro aplikaci genových terapií a tato závažná nežádoucí událost se již neopakovala.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

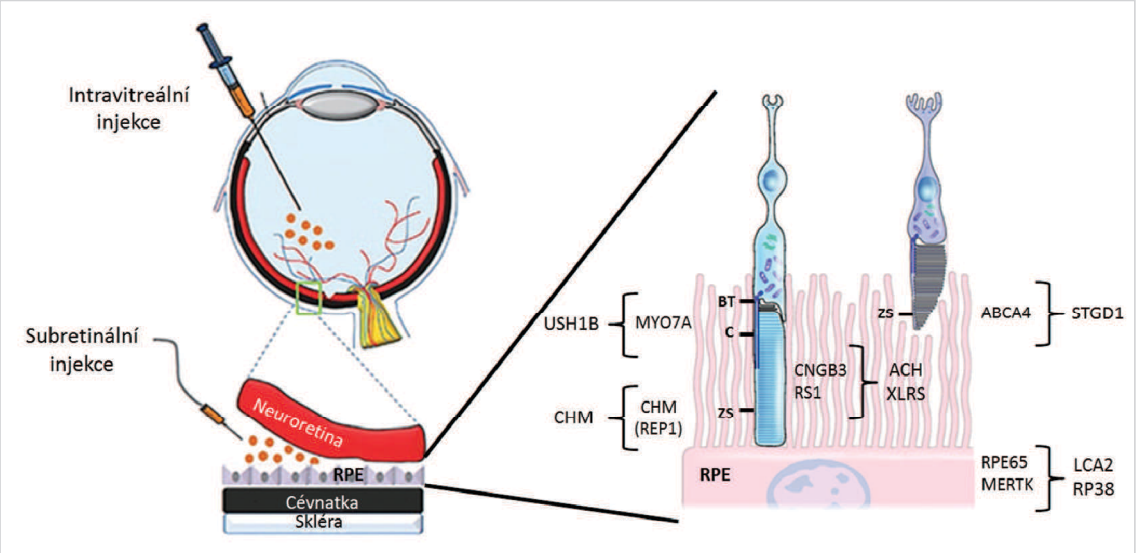
www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal



Obr. 2 Schéma přípravy cDNA (A), struktura původního (B) a upraveného (C) virového vektoru

Způsoby aplikace vektorů

Při léčbě onemocnění sítnice se k aplikaci vektorů nejčastěji využívají intravitreální a subretinální injekce (obr. 3, tab. 2). Aplikace do sklivce je sice pro sítnici méně invazivní, ale transdukce probíhá zejména ve vnitřních vrstvách sítnice, tedy v buňkách Müllerových a gangliových. Bariéru průniku vektorů a léčiv do větší hloubky sítnice tvoří vnitřní limitující membrána a další sítnicové vrstvy. Pro aplikaci virových vektorů do vrstvy fotoreceptorů a vrstvy buněk retinálního pigmentového epitelu (RPE) je vhodnější subretinální aplikace, kdy je vektor injikován do puchýřku mezi uvedenými vrstvami, a je tak s nimi v těsném kontaktu. Během 14 hodin buňky RPE subretinální tekutinu obsahující virový vektor kompletně absorbují. Účinnost je 5-10x vyšší než při podání do sklivce. Nevýhodou je však větší riziko možných komplikací spojených s chirurgickým výkonem (tab. 2) (35).



Obr. 3 Způsoby aplikace virových vektorů a lokalizace proteinů kódovaných geny, jejichž mutace způsobují retinální onemocnění a pro které probíhají klinické zkoušky s genovou terapií (převzato z http://www.retinalphysician.com a 53). **ABCA4** - ATP-binding cassette, subfamily A, member 4; **ACH** – achromatopsie; **BT** – bazální tělísko; **C** – cilium; **CNGB3** - Cyclic Nucleotide Gated Channel Beta 3; **CHM** – chorioideremie; **CHM (REP1)** - Rab Escort Protein 1; **LCA2** – Leberova kongenitální amauróza typ 2; **MERTK** - Mer receptor tyrosine kinase; **MYO7A** – myosin VIIA; **RPE** – retinální pigmentový epitel; **RPE65** - retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein; **RP38** – retinitis pigmentosa 38; **RS1** – retinoschin; **STGD1** – Stargardtova choroba typ 1; **USH1B** – Usherův syndrom typ 1B; **XLRS** – X-vázaná retinoschíza; **ZS** – zevní segment

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

Tab. 2 Různé způsoby aplikace vektorů u onemocnění sítnice (57)

Způsob podání	Cílové buňky	Výhody	Nevýhody
Intravenózní	Vnitřní vrstvy sítnice	Žádné oční nežádoucí účinky spojené s nitroočním chirurgickým zákrokem	Opsonizace a fagocytóza částic, transfekce jiných tkání
Periokulární	Fotoreceptory, RPE	Neinvazivní pro sítnici	Nízká transfekce sítnice a RPE
Intravitreální	Vnitřní vrstvy sítnice	Zřídka oční nežádoucí účinky	Riziko endoftalmitidy a odchlípení sítnice
Subretinální	Fotoreceptory, RPE	Nejvyšší účinek transfekce	Invazivní, odchlípení sítnice může vést k buněčné smrti
Suprachorioideální	Fotoreceptory, RPE	Nedochází k elevaci neuroretiny	Vyšší rychlost eliminace

RPE – retinální pigmentový epitel

Genové terapie onemocnění sítnice ve stadiu klinických zkoušek

Klinické testování má několik fází. Ve fázi I se na jedné nerandomizované skupině dobrovolníků stanovuje maximálně tolerovaná dávka a sleduje se bezpečnost. Ve fázi II se již na pacientech zjišťuje účinná dávka léku, opět většinou v rámci nerandomizované studie. Ve fázi III je jedna skupina léčena běžnými postupy, druhé skupině je podávána léčba nová. Porovnává se tedy účinnost nového léku se standardní terapií. Zařazení i hodnocení bývají dvojitě zaslepené. Na základě výsledků fáze III pak může být lék zaregistrován. V poslední fázi IV se sledují nežádoucí účinky léčiva po registraci a při dlouhodobém užívání (https://clinicaltrials.gov/ct2/about-studies/learn) (24).

Leberova kongenitální amauróza 2

Leberova kongenitální amauróza (LCA) je geneticky heterogenní skupina onemocnění podmíněných mutacemi v nejméně 22 genech (23). LCA2 (OMIM #204100) je autozomálně recesivní choroba vznikající na podkladě mutací v genu *RPE65* (retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein) (18). Tento gen je téměř výlučně exprimován v RPE, kde se podílí na recyklaci opsinu a rodopsinu tím, že konvertuje all-*trans*-retinoidy na 11-*cis* retinal. Nedostatečná funkce nebo absence *RPE65* vede k hromadění *trans*-retinyl esterů s následnou degenerací fotoreceptorů (10).

Přestože výskyt onemocnění je relativně vzácný (méně než 1 postižený na 1 000 000 narozených dětí), byla LCA2 navržena pro genovou terapii, a to hlavně kvůli časné manifestaci onemocnění, relativně dlouho zachované struktuře sítnice a dostupnosti zvířecích modelů (8). První výsledky léčby psího modelu publikované již v roce 2001 ukázaly významné dlouhotrvající zlepšení zrakových funkcí po subretinální aplikaci rekombinantního adeno-asociovaného viru (AAV2) obsahujícího *RPE65* cDNA (1). V roce 2007 byly pak registrovány první klinické zkoušky fáze I (NCT00481546, NCT00516477; clinicaltrials.gov) a fáze II (NCT00643747; clinicaltrials.gov), do kterých bylo naplánováno zařadit do května 2015 celkově 39 pacientů s LCA2 (clinicaltrials.gov). V současné době probíhá studie fáze III se subretinálním podáním upraveného AAV2 (NCT00999609; clinicaltrials.gov).

U všech pacientů došlo ke zlepšení zrakové ostrosti léčeného oka, nicméně v dosti rozdílné míře (6, 22, 35). Zlepšila se také orientace léčených při slabém osvětlení. Citlivost sítnice měřená pomocí psychofyziologického testu s modrými a červenými stimuly na bílém a barevném pozadí po adaptaci na tmu (47) se během 1 až 2 měsíců po podání vektoru zvýšila. Další zlepšování pak bylo pozorováno po dobu 6 až 12 měsíců. Následně začala citlivost sítnice opět klesat, přesto však u některých pacientů zůstala po 3 letech vyšší než před podáním genové terapie. Zlepšeny byly i části zorného pole odpovídající umístění subretinální injekce vektoru, přičemž u 40 % pacientů vznikla v těchto oblastech excentrická fixace (8). Podstatnější zlepšení funkce sítnice bylo pozorováno u starších pacientů. Oproti psím modelům však nebyly u lidí detekovatelné změny při elektroretinografickém vyšetření. Poslední publikovaná práce zjistila, že degenerativní procesy fotoreceptorových buněk sítnice se po genové terapii nezastavily a pokračovaly dál. Předpokládá se, že účinek této léčby je vysoce závislý na podaném množství vektoru a že aplikované dávky byly nízké (5).

Retinitis pigmentosa 38

Nesyndromová retinitis pigmentosa (RP) je geneticky heterogenní skupina progresivních onemocnění sítnice podmíněných mutacemi v nejméně 50 genech (https://sph.uth.edu/retnet/). RP38 (OMIM #613862) je velmi vzácná autozomálně recesivní forma RP asociovaná s mutacemi v genu *MERTK* (Mer proto-oncogene, tyrosine kinase) způsobující 1 % nesyndromových RP (44). MERTK je enzym potřebný k fagocytóze odloučených zevních segmentů fotoreceptorů RPE. Ztráta enzymu podmiňuje poruchu fagocytózy fotoreceptorů s akumulací nedegradovaných metabolitů rhodopsinu mezi nimi, což vede k jejich apoptóze a degeneraci sítnice (12). Charakteristickým znakem časné fáze RP38 jsou tečkovitá autofluorescentní sítnicová depozita. Šeroslepost vzniká již v první dekádě života, následuje postižení funkce čípků, často s atrofií makuly (11).

Již dlouhou dobu jsou studovány krysí modely s mutacemi v genu *MERTK*. Dochází u nich k velmi rychlé akumulaci metabolitů mezi fotoreceptory, ztrátě fotoreceptorů od 20. dne po narození a jejich úplnému chybění od 60. dne. Proto jsou tyto modely vhodné i pro hodnocení postupů a účinnosti genové terapie u lidí.

V preklinické studii byly do sítnice krysího modelu pomocí lentivirových vektorů vneseny funkční kopie genu *MERTK*, což vedlo k zachování a u některých zvířat i k částečnému obnovení funkcí sítnice 7 měsíců od aplikace (52). Nedávná

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

studie na krysím modelu ukázala, že aminokyselinová záměna tyrozinu za fenylalanin na pozici 733 v kapsidě AAV vektoru umožnila zachování struktury a funkce sítnice nejméně 1 rok po aplikaci (13).

V klinické studii fáze I registrované v roce 2011 (NCT01482195; clinicaltrials.gov) byl třem pacientům subretinálně aplikován AAV2 vektor obnovující funkci genu *MERTK* bez závažných nežádoucích účinků (8).

Usherův syndrom 1B

Usherův syndrom (USH) je geneticky heterogenní onemocnění, dosud bylo nalezeno nebo mapováno 11 příčinných genů. Autozomálně recesivní typ 1 je způsoben mutacemi v pěti známých genech (39). Všechny jsou exprimovány ve vláskových buňkách vnitřního ucha a fotoreceptorech sítnice. Forma USH1B (OMIM #276900) je způsobená mutacemi v *MYO7A* (myosin VIIA), jehož produkt hraje v buňkách fotoreceptorů a RPE důležitou roli v transportu opsinu a je nezbytný pro normální průběh Waldova cyklu (33). Na rozdíl od vláskových buněk ucha, není vývoj fotoreceptorů postižen a k jejich odumírání dochází až v průběhu života v důsledku hromadění metabolitů a následné dysfunkci synapsí (8). USH1B je nejzávažnější formou syndromu s vrozenou ztrátou sluchových funkcí, s postižením zrakových funkcí během první dekády života a s vestibulární areflexií. Jeho prevalence je v evropské populaci odhadována 4,2 případu na 100 000 obyvatel (16).

Z důvodů značné velikosti genu *MYO7A* byly pro jeho přenos zvoleny vektory lentivirové, které mají větší kapacitu pro přenášený gen, avšak nižší účinnost transdukce ve fotoreceptorech než vektory AAV. Na myším modelu bylo prokázáno obnovení transportu opsinu (21), což vedlo v roce 2012 k zahájení klinické studie fáze I/IIa s lékem UshStat (NCT01505062; clinicaltrials.gov). Předběžné výsledky těchto studií nebyly dosud publikovány. Jelikož u USH1B dochází již od počátku onemocnění k poškození fotoreceptorů, jsou dalším krokem pokusy o sbalení *MYO7A* do účinnějšího AAV vektoru, který je schopen exprese i v tomto typu buněk (8).

Stargardtova choroba

Stargardtova choroba je geneticky heterogenní onemocnění způsobené mutacemi ve třech genech. Nejčastější autozomálně recesivní typ Stargardtovy choroby (STGD1, OMIM #248200) je podmíněn mutacemi v genu *ABCA4* (ATP-binding cassette subfamily A member 4), který kóduje protein podílející se na transportu použitých částí fotoreceptorů do RPE (2). Mutace v této lipáze ovlivňují zpracování vitamínu A, což vede k akumulaci toxického bisretinoidu A2E, tzv. dimeru vitamínu A. Následkem je odumírání buněk RPE a fotoreceptorů (57).

Charakteristickým klinickým nálezem Stargardtovy choroby, kterou je postižen 1 z 10 000 obyvatel, je přítomnost žlutavých skvrn v makule, popř. i difúzně po celém fundu spolu se ztenčováním vrstev sítnice v makule. Postupně vzniká v makule jizva se žlutými skvrnami charakteru lipofuscinových depozit při okrajích nebo i po celém očním pozadí (32, 46).

Protože velikost cDNA genu *ABCA4* značně přesahuje kapacitu běžných AAV, byly při vývoji genové terapie použity lentivirové vektory. Na základě pozitivních výsledků na myším modelu (29) byla v roce 2011 registrována klinická studie fáze I/II s lékem StarGen (NCT01367444; clinicaltrials.gov). Její výsledky nebyly doposud publikovány. V další studii z roku 2012 byly pro přenos funkční kopie *ABCA4* na myším modelu pro tuto chorobu využity nanočástice. Po aplikaci byla zaznamenána perzistentní exprese *ABCA4*, zlepšení adaptace na tmu a snížení ukládání lipofuscinu. Tento postup však ještě nebyl registrován pro klinické studie (20).

Chorioideremie

Chorioideremie (OMIM #303100) je onemocnění sítnice s dědičností vázanou na chromozóm X a postihující 1 z 50 000 mužů. Chorobu způsobují mutace v genu *CHM* (Rab Escort Protein 1), jehož produkt prostřednictvím posttranslační modifikace (prenylace) proteinů reguluje transport vezikul v procesech endocytózy a exocytózy (34). Pacienti s chorioideremií mají snížené nebo nulové množství tohoto enzymu, což vede k poruchám transportu opsinu do zevních segmentů fotoreceptorů, k poruchám migrace melanozomů v buňkách RPE a ke snížené fagocytóze zevních segmentů fotoreceptorů buňkami RPE (3). Následkem je degenerace choriokapilaris, RPE a fotoreceptorů. Není však jasné, která část sítnice je u chorioideremie primárně postižená. Je známo, že nedostatek CHM vede k funkčnímu postižení sítnice ještě před odumíráním RPE, nebylo ale objasněno, zda se jedná o důsledek deficitu nebo nespecifický vliv stresu RPE buněk (14). Vzhledem k tomu, že u chorioideremie dochází k poškození cévnatky i sítnice včetně RPE, je nutné zajistit efektivní transdukci vektorů ve více vrstvách buněk.

Prvním krokem ve vývoji genové terapie byla příprava AAV vektoru, který vpravil celý gen *CHM* do lymfocytů a fibroblastů získaných od pacientů s chorioideremií (4). V další fázi byl připraven lentivirový vektor, jehož aplikace vedla na myším modelu k částečnému obnovení enzymatické aktivity v buňkách RPE (51). V roce 2011 byla registrována klinická studie (NCT01461213; clinicaltrials.gov), v rámci které byla 6 pacientům aplikována do subretinálního prostoru funkční kopie *CHM* pomocí AAV vektoru. U všech pacientů bylo za 6 měsíců po léčbě pozorováno zvýšení citlivosti sítnice při mikroperimetrii. Průměrná zraková ostrost se zlepšila o 3,8 písmene na optotypech ETDRS (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study). V roce 2015 byly registrovány další 3 genové terapie využívající stejný postup (NCT02341807, NCT02553135, NCT02407678; clinicaltrials.gov).

Leberova hereditární neuropatie optiku

Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON; OMIM #535000) je nejčastějším mitochondriálním onemocněním projevujícím se oboustrannou akutní nebo subakutní ztrátou zraku (31, 43). Specifické mutace v mitochondriálních genech způsobují u LHON degeneraci retinálních gangliových buněk a atrofii optického nervu. Ve více než 90 % případů se zjišťuje jedna ze tří mutací v genech *MT-ND1* (mitochondrially encoded NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit 1), *MT-ND4* a *MT-ND6* (43).

Tyto mutace vedou k chybnému uspořádání komplexu I respiračního řetězce v mitochondriích, což ovlivňuje tvorbu ATP a vznik nežádoucího množství reaktivních kyslíkových radikálů. Prozatím není jasné, proč efekt těchto mutací po-

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

stihuje především zrakový nerv a nikoliv nervovou soustavu jako celek (9).

Transfekování mitochondriální DNA je velice obtížné. Pro vývoj genové terapie bylo potřebné připravit vektor transfekující jadernou DNA se sekvencí, která nasměruje protein vzniklý v cytoplazmě do mitochondrie. Tento postup byl vyzkoušen na myším a krysím modelu (15, 19). Intravitreální aplikace vedla k delšímu zachování retinálních gangliových buněk a ke zlepšení zraku u modelových zvířat.

Průběžné výsledky studie fáze III (NCT01267422; clinicaltrials.gov) s intravitreální aplikací AAV vektoru s genem *MT--ND4* u 9 pacientů prokázaly zlepšení zrakové ostrosti a citlivosti zorného pole. Tloušťka vrstvy nervových vláken sítnice se však nezvýšila (55).

Achromatopsie

Achromatopsie (OMIM #262300) je charakterizována poruchou funkce čípků a vyskytuje se s prevalencí 1 na 30 000 obyvatel (50). Z pěti dosud popsaných genů, odpovědných za vznik onemocnění, jsou mutace v genu *CNGB3* (cyclic nucleotide gated channel beta 3) příčinou přibližně 50 % případů (27). Narušením tvorby CNG kanálů (cyclic nucleotide-gated ion channel) dochází k influxu kationů do buněk, což vede až k jejich apoptóze. Na rozdíl od čípků se tyto kanály nevyskytují na tyčinkách, skotopické vidění proto zůstává zachováno (38).

Subretinální aplikace AAV vektoru nesoucího gen *CNGB3* testovaná na psích modelech prokázala možnost obnovení funkce čípků a fotopického vidění nezávisle na pozici mutace. Terapeutická účinnost a stabilita exprese vneseného genu však byla ovlivněna věkem testovaného zvířete v době podání a typem použitého promotoru (28).

V listopadu 2015 byly zahájeny dvě klinické zkoušky fáze I a II se subretinální aplikací AAV vektorů (NCT02610582, NCT02599922; clinicaltrials.gov).

X-vázaná retinoschíza

X-vázaná retinoschíza (XLRS, OMIM #312700) je monogenně podmíněné oční onemocnění s manifestací v první dekádě života s prevalencí 1 nemocný na 5–25 000 obyvatel (17). Choroba je způsobena mutacemi v genu *RS1* (retinoschisin 1), které vedou u pacientů mužského pohlaví k rozštěpu častěji vnitřních vrstev sítnice obvykle v makulární oblasti provázenému poklesem zrakové ostrosti (45). Produkt genu je exprimován ve fotoreceptorech a bipolárních buňkách sítnice. Jeho funkce není úplně objasněna, ale předpokládá se, že se podílí na adhezi uvedených buněk (41).

Na myším modelu byly odzkoušeny různé sérotypy AAV vektorů. Jejich účinnost závisí od použitého promotoru a taky od stáří testovaného zvířete. Injekce AAV vektoru do sítnice myšího modelu ve věku 7 měsíců zlepšila strukturu retiny, ne však elektroretinografické parametry. U mladších zvířat dochází po aplikaci k zachování a částečnému vylepšení struktury a funkce retiny. Tyto studie poukázaly, že před zavedením genové terapie pro XLRS je potřeba pečlivě zvážit způsob doručení, výběr vektoru a typ použitého promotoru (8).

V roce 2015 byly registrovány dvě klinické studie (NCT02317887 a NCT02416622; clinicaltrials.gov) fáze I a II s intravitreální aplikací AAV sérotypu 2 a 8.

Genové terapie v kontextu České republiky

Ani jedna z několika desítek klinických studií testujících genovou terapii pro oční choroby, které v současné době probíhají, není realizována na pracovištích v ČR. Nepříznivá situace má několik důvodů. Zásadní je chybění legislativy stanovující pravidla pro klinické studie aplikující genové terapie, což znemožňuje českým klinickým pracovištím účastnit se mezinárodních multicentrických studií. Svůj podíl má i nedostatek odborníků, kteří mohou nové přípravky kontrolovat a nízká informovanost laické a často i odborné veřejnosti o vzácných chorobách, dědičná onemocnění oka nevyjímaje.

ZÁVĚR

Genové terapie představují nadějný přístup v léčbě onemocnění oka, obzvláště u chorob sítnice, kde zatím nejsou k dispozici žádné fungující léky či terapeutické metody. Potrvá však ještě několik let než budou výsledky v současné době probíhajících klinických studií vyhodnoceny a bude prokázán jejich případný dlouhodobý příznivý účinek.

Práce byla podpořena granty GAUK 4315/2015, SVV UK 260256/2016, UNCE 204011 a AZV 16-32341A.

LITERATURA

1. **Acland, GM., Aguirre, GD., Ray J.,et al.:** Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. Nat Genet, 28; 2001: 92–5.
2. **Allikmets, R., Shroyer, NF., Singh, N.,et al.:** Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. Science, 277; 1997: 1805–7.
3. **Alory, C., Balch, WE.:** Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease. Traffic, 2; 2001: 532–43.
4. **Anand, V., Barral, DC., Zeng, Y., et al.:** Gene therapy for choroideremia: in vitro rescue mediated by recombinant adenovirus. Vision Res, 43; 2003: 919–26.
5. **Bainbridge, JW., Mehat, MS., Sundaram, V., et al.:** Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med, 372; 2015: 1887–97.
6. **Bainbridge, JW., Smith, AJ., Barker, SS., et al.:** Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med, 358; 2008: 2231–39.
7. **Bessis, N., GarciaCozar, FJ., Boissier MC.:** Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. Gene Ther, 11 Suppl 1; 2004: S10–7.
8. **Boye, SE., GarciaCozar, FJ., Boissier, MC.:** A comprehensive review of retinal gene therapy. Mol Ther, 21; 2013: 509–19.
9. **Carelli, V., La Morgia, C., Valentino, ML., et al.:** Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. Biochim Biophys Acta, 1787; 2009: 518–28.
10. **Cideciyan, AV.:** Leber congenital amau-

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

rosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. Prog Retin Eye Res, 29; 2010: 398–427.
11. **Conlon, TJ., Deng, WT., Erger, K., et al.:** Preclinical potency and safety studies of an AAV2-mediated gene therapy vector for the treatment of MERTK associated retinitis pigmentosa. Hum Gene Ther Clin Dev, 24; 2013: 23–8.
12. **D'Cruz, PM., Yasumura, D., Weir, J., et al.:** Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. Hum Mol Genet, 9; 2000: 645-51.
13. **Deng, WT., Dinculescu, A., Li, Q., et al.:** Tyrosine-mutant AAV8 delivery of human MERTK provides long-term retinal preservation in RCS rats. Invest Ophthalmol Vis Sci, 53; 2012: 1895–1904.
14. **Dimopoulos, IS., Chan, S., MacLaren, RE., et al.:** Pathogenic mechanisms and the prospect of gene therapy for choroideremia. Expert Opin Orphan Drugs, 3; 2015: 787–98.
15. **Ellouze, S., Augustin, S., Bouaita, A., et al.:** Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. Am J Hum Genet, 83; 2008: 373–87.
16. **Espinos, C., Millan, JM., Beneyto, M., et al.:** Epidemiology of Usher syndrome in Valencia and Spain. Community Genet, 1; 1998: 223–8.
17. **George, ND., Yates, JR., Moore, AT.:** X linked retinoschisis. Br J Ophthalmol, 79; 1995: 697–702.
18. **Gu, SM., Thompson, DA., Srikumari, CR., et al.:** Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. Nat Genet, 17; 1997: 194–7.
19. **Guy, J., Qi, X., Koilkonda, RD., et al.:** Efficiency and safety of AAV-mediated gene delivery of the human ND4 complex I subunit in the mouse visual system. Invest Ophthalmol Vis Sci, 50; 2009: 4205–14.
20. **Han, Z., Conley, SM., Makkia, RS., et al.:** DNA nanoparticle-mediated ABCA4 delivery rescues Stargardt dystrophy in mice. J Clin Invest, 122; 2012: 3221–6.
21. **Hashimoto, T., Gibbs, D., Lillo, C., et al.:** Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. Gene Ther, 14; 2007: 584–94.
22. **Hauswirth, WW., Aleman, TS., Kaushal, S., et al.:** Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno--associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. Hum Gene Ther, 19; 2008: 979–90.
23. **Chacon-Camacho, OF., Zenteno, JC.:** Review and update on the molecular basis of Leber congenital amaurosis. World J Clin Cases, 3; 2015: 112–24.
24. **Kao, LS., Tyson, JE., Blakely, ML., et al.:** Clinical research methodology I: introduction to randomized trials. J Am Coll Surg, 206; 2008: 361–9.
25. **Kaufmann, KB., Buning, H., Galy, A., et al.:** Gene therapy on the move. EMBO Mol Med, 5; 2013: 1642–61.
26. **Kay, MA., Glorioso, JC., Naldini, L.:** Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. Nat Med, 7; 2001: 33–40.
27. **Kohl, S., Varsanyi, B., Antunes, GA., et al.:** CNGB3 mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia. Eur J Hum Genet, 13; 2005: 302–8.
28. **Komaromy, AM., Alexander, JJ., Rowlan, JS., et al.:** Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. Hum Mol Genet, 19; 2010: 2581–93.
29. **Kong, J., Kim, SR., Binley, K., et al.:** Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. Gene Ther, 15; 2008: 1311–20.
30. **Kotterman, MA., Yin, L., Strazzeri, JM., et al.:** Antibody neutralization poses a barrier to intravitreal adeno-associated viral vector gene delivery to non-human primates. Gene Ther, 22; 2015: 116–26.
31. **Leber, T.:** Ueber hereditäre und congenital-angelegte Sehnervenleiden [About hereditary and congenital optic nerve disorders]. Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol, 17; 1871: 249–91.
32. **Lois, N., Holder, GE., Bunce, C., et al.:** Phenotypic subtypes of Stargardt macular dystrophy-fundus flavimaculatus. Arch Ophthalmol, 119; 2001: 359–69.
33. **Lopes, VS., Gibbs, D., Libby, RT., et al.:** The Usher 1B protein, MYO7A, is required for normal localization and function of the visual retinoid cycle enzyme, RPE65. Hum Mol Genet, 20; 2011: 2560–70.
34. **MacDonald IM., Hume S., Chan S., et al.:** Choroideremia. GeneReviews® [online]. 2003-2015 [cit. 11. dubna 2016]. Dostupný z WWW: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1337/>.
35. **Maguire, AM., Simonelli, F., Pierce, EA., et al.:** Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med, 358; 2008: 2240–48.
36. **Mali, S.:** Delivery systems for gene therapy. Indian J Hum Genet, 19; 2013: 3-8.
37. **Martin, KR., Quigley, HA.:** Gene therapy for optic nerve disease. Eye (Lond), 18; 2004: 1049–55.
38. **Meighan, PC., Peng, C., Varnum, MD.:** Inherited macular degeneration-associated mutations in CNGB3 increase the ligand sensitivity and spontaneous open probability of cone cyclic nucleotide-gated channels. Front Physiol, 6; 2015: 177.
39. **Millan, JM., Aller, E., Jaijo, T., et al.:** An update on the genetics of usher syndrome. J Ophthalmol, 2011; 2011: 417217.
40. **Misra, S.:** Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution. J Assoc Physicians India, 61; 2013: 127–33.
41. **Molday, LL., Hicks, D., Sauer, CG., et al.:** Expression of X-linked retinoschisis protein RS1 in photoreceptor and bipolar cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 42; 2001: 816–25.
42. **Mukherjee, S., Thrasher, AJ.:** Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. Gene, 525; 2013: 174–81.
43. **Newman, NJ.:** Hereditary optic neuropathies: from the mitochondria to the optic nerve. Am J Ophthalmol, 140; 2005: 517–23.
44. **Ostergaard, E., Duno, M., Batbayli, M., et al.:** A novel MERTK deletion is a common founder mutation in the Faroe Islands and is responsible for a high proportion of retinitis pigmentosa cases. Mol Vis, 17; 2011: 1485–92.
45. **Prenner, JL., Capone Jr., A., Ciaccia, S., et al.:** Congenital X-linked retinoschisis classification system. Retina, 26; 2006: S61–4.
46. **Rivera, A., White, K., Stohr, H., et al.:** A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. Am J Hum Genet, 67; 2000: 800–13.
47. **Roman, AJ., Cideciyan, AV., Aleman, TS., et al.:** Full-field stimulus testing (FST) to quantify visual perception in severely blind candidates for treatment trials. Physiol Meas, 28; 2007: N51–6.
48. **Sibbald, B.:** Death but one unintended consequence of gene-therapy trial. CMAJ, 164; 2001: 1612.
49. **Steinkuller, PG., Du, L., Gilbert, C., et al.:** Childhood blindness. J AAPOS, 3; 1999: 26–32.
50. **Thiadens, AA., Somervuo, V., van den Born, LI., et al.:** Progressive loss of cones in achromatopsia: an imaging study using spectral-domain optical coherence tomography. Invest Ophthalmol Vis Sci, 51; 2010: 5952–7.
51. **Tolmachova, T., Tolmachov, OE., Wavre-Shapton, ST., et al.:** CHM/REP1 cDNA delivery by lentiviral vectors provides functional expression of the tran-

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

www.prolekare.cz | stazeno: 21.11.2016 | login: bohdankousal

sgene in the retinal pigment epithelium of choroideremia mice. J Gene Med, 14; 2012: 158–68.
52. **Tschernutter, M., Schlichtenbrede, FC., Howe, S., et al.:** Long-term preservation of retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy. Gene Ther, 12; 2005: 694–701.
53. **Veleri, S. Lazar, CH., Chang, B., et al.:** Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. Dis Model Mech, 8; 2015:109–29.
54. **Verma, IM., Somia N.:** Gene therapy -- promises, problems and prospects. Nature, 389; 1997: 239–42.
55. **Wan, X., Fei, H., Zhao, MJ., et. al.:** Efficacy and safety of RAAVZ-NDY treatment for leber´s hereditary optic neuropathy. Sci Rep, 19; 2016: 1–10.
56. **Wang, D., Gao, G.:** State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. Discov Med, 18; 2014: 151–61.
57. **Weng, J., Mata, NL., Azarian, SM., et al.:** Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. Cell, 98; 1999: 13–23.

Tento clanek podleha autorskemu zakonu a jeho vyuziti je mozne v souladu s pravnim prohlasenim: www.prolekare.cz/prohlaseni

Supplement 12]

***Kolarova, H.**, Tesarova, M., Svecova, S., Stranecky, V., Pristoupilova, A., Zima, T., Uhrova, J., Volgina, S.Y., Zeman, J., Honzik, T.*

Lipoprotein lipase deficiency: clinical, biochemical and molecular characteristics in three patients with novel mutations in the LPL gene.

Folia Biol 2014 60(5), 235-43.

[IF: 1,0]

Original Article

Lipoprotein Lipase Deficiency: Clinical, Biochemical and Molecular Characteristics in Three Patients with Novel Mutations in the *LPL* Gene

(lipoprotein lipase deficiency / hypertriglyceridaemia / hypercholesterolaemia / hepatosplenomegaly / acute pancreatitis / lipaemia retinalis)

H. KOLÁŘOVÁ[1], M. TESAŘOVÁ[1], Š. ŠVECOVÁ[1], V. STRÁNECKÝ[2], A. PŘISTOUPILOVÁ[2], T. ZIMA[3], J. UHROVÁ[3], S. Y. VOLGINA[4], J. ZEMAN[1], T. HONZÍK[1]

[1]Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, [2]Institute of Inherited Metabolic Disorders, [3]Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic
[4]Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Abstract. Lipoprotein lipase (LPL) deficiency, caused by mutations in the *LPL* gene, is a rare autosomal recessive disorder manifesting in early childhood with recurrent abdominal pain, hepatosplenomegaly, acute pancreatitis, lipaemia retinalis and eruptive xanthomas. Typical laboratory findings are lactescent serum, extreme hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia. The diagnostics is based on post-heparin serum LPL assay and DNA analyses of the *LPL* gene. We report clinical, biochemical and molecular data of three children with LPL deficiency. One child manifested since the first week of life with recurrent abdominal pain (Patient 1), the second with abdominal distension and hepatosplenomegaly since the second month of life (Patient 3) and patient 2, asymptomatic younger brother of patient 1, was diagnosed in the first week of life. Lipaemia retinalis and splenomegaly were present in two symptomatic children, hepatomegaly in patient 3 and acute pancreatitis in patient 1. All children had lactescent serum, profound hypertriglyceridaemia (124 ± 25 mmol/l; controls < 2.2), hypercholesterolaemia (22.8 ± 7.3 mmol/l, controls < 4.2) and their LPL immunoreactive mass in serum did not increase after heparin injection. Molecular analyses revealed that both siblings are homozygous for novel mutation c.476C > G in the *LPL* gene changing the conserved amino acid of the catalytic centre. The third patient is a compound heterozygote for mutations c.604G>A and c.698A>G in the *LPL* gene, both affecting highly conserved amino acids. We conclude that LPL deficiency must be considered in neonates and young infants with abdominal pain and hypertriglyceridaemia because early treatment might prevent development of life-threatening acute pancreatitis.

Introduction

Familial lipoprotein lipase (LPL) deficiency is a rare autosomal recessive disorder caused by loss-of-function mutations in the *LPL* gene (Evans and Kastelein, 2003). The general prevalence of this disease is one in a million (Rahalkar et al., 2009) in contrast to the French-Canadian population of Québec with the carrier frequency 1 : 40 attributed to the founder effect (Gagne et al., 1989).

LPL is a key enzyme in hydrolysation of serum triglycerides (TG) in chylomicrons (CM) and very low-density lipoproteins (VLDL). The enzyme is present in capillaries of adipose tissue, skeletal muscle, adrenal glands, kidney, intestine and neonatal liver (Siafakas et al., 1999). LPL deficiency usually manifests in childhood as abdominal pain, failure to thrive, hepatosplenomegaly, lipaemia retinalis or eruptive xanthomas. The most se-

Received February 27, 2014. Accepted March 17, 2014.

Institutional support was provided by PRVOUK P49/LF1/3, PRVOUK P24/LF1/3 from Charles University in Prague, by Research Project RVO-VFN64165/2012 and UNCE 204011.

Corresponding author: Tomáš Honzík, Department of Paediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 128 08 Prague 2, Czech Republic. Phone: (+420) 224 967 792; fax: (+420) 224 967 713; e-mail: tomas.honzik@vfn.cz

Abbreviations: CM – chylomicrons, GPIHBP1 – glycosylphosphatidylinositol anchored-HDL-binding protein 1, HC – hypercholesterolaemia, HDL – high-density lipoprotein, HTG – hypertriglyceridaemia, LPL – lipoprotein lipase, MCT – medium-chain triglyceride, SNP – single-nucleotide polymorphism, TG – triglycerides, VLDL – very low-density lipoproteins.

vere and life-threatening complication is acute pancreatitis (Brunzell et al., 2001). Typical laboratory characteristics are lactescent plasma/serum with milky-cream appearance, hypertriglyceridaemia (HTG) and hypercholesterolaemia (HC) with very low level of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol < 0.5 mmol/l (Santamarina-Fojo, 1998; Rahalkar et al., 2009).

We present clinical, biochemical and molecular data of three children from two unrelated families with LPL deficiency. Three novel mutations in the *LPL* gene and our experience with the therapeutic strategy are described.

Material and Methods

Patients

Patient 1

The girl was born at term with a birth weight of 2700 g (12th percentile) and length of 48 cm (17th percentile). Her mother, mother's sister and father and maternal grandmother are clinically healthy but all have HTG (2.43, 4.85; 11; 4.4 mmol/l, respectively; reference range < 1.7). Her father is healthy, his parents have cholesterol 5.34 and 5.42 mmol/l (reference range < 5.2).

Since birth, the girl manifested an abdominal distention, tenderness and irritability assessed as infantile colics. At the age of 2.5 months, she was admitted to hospital because of loss of appetite, constant crying and abdominal distention with ascites and splenomegaly. Eruptive xanthomas were not present. Her serum had a milky-cream appearance (Fig. 1) with HC 33.1 mmol/l (reference range < 4.2) and HTG 12.3 mmol/l (reference range < 2.2). The HDL cholesterol concentration was decreased to 0.81 mmol/l (reference range 1–1.8). Aminotransferases were elevated (ALT 6.6 μkat/l, reference range < 0.85; AST 4.3 μkat/l, reference range < 0.97). She was anaemic with a need of a blood transfusion (haematocrit 0.18, erythrocytes 2.1×10^{12}/l, MCV 85.2 fl, haemoglobin concentration could not be obtained due to lactescent serum). Abdominal ultrasound revealed splenomegaly (78 mm, controls 3.46 ± 0.52 mm), enlarged kidneys (60 mm, controls 52.8 ± 0.66 mm) and ascites. Necrotic debris with exudation caused by endured pancreatitis and lipoid necrosis of the omentum were described during an exploring laparotomy. Liver biopsy revealed steatosis with mild fibrosis. Ophthalmologic examination revealed whitish veins compatible with lipaemia retinalis. ECG and echocardiography examinations were normal.

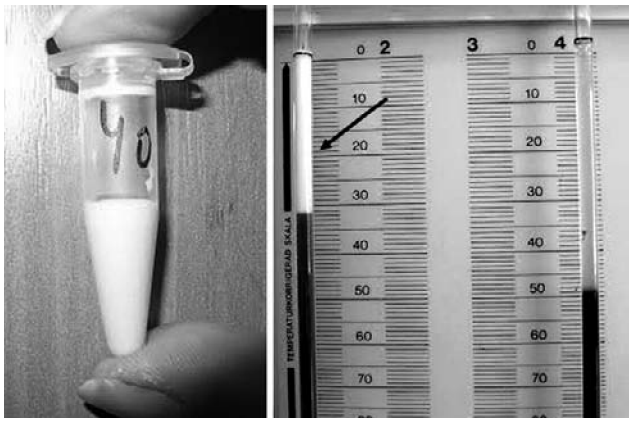


Fig. 1. Milky-cream, lipaemic appearance of the serum in P1 with LPL deficiency and hypertriglyceridaemia of 93 mmol/l.

After breastfeeding was reintroduced, a rapid increase of TG to 93 mmol/l and cholesterol to 13.4 mmol/l was documented. Spleen enlargement had diminished within days and profound HTG and HC decreased rapidly when a milk formula (Basic F® – MILUPA AG, Friedrichsdorf, Germany) with very low fat content (0.1 g of fat/100 ml) was introduced. Later on, the girl has thrived well on the low fat diet (0.6 g of fat/kg/day) supplemented with MCT oil (1 ml/kg/day), polyunsaturated fatty acids (PUFAs), vitamins A, E, D and calcium.

The girl is now 6.5-year-old, her weight is 22 kg (35th percentile) and height 122.5 cm (35th percentile). During the follow up, her TG levels are 6.4 ± 3.2 mmol/l, cholesterol 4.05 ± 0.57 mmol/l) and HDL-cholesterol 0.46 ± 0.06 mmol/l.

Patient 2

The younger brother of patient 1 was born at term with birth weight 3390 g (30th percentile) and length 51 cm (55th percentile). Due to a positive family history, laboratory analyses performed on the fifth day of life revealed a profound HTG (126 mmol/l (reference range < 2.2) and HC 17.6 mmol/l (reference range < 4.2). Low-fat diet with a smaller amount of breast milk combined with Basic F® formula was started, the daily intake of fat was approx. 0.7 g/kg and day. The diet was supplemented with fat-soluble vitamins. Cholesterol levels had normalized on the diet, but mild HTG persisted (TG 5.3 mmol/l). Aminotransferases and pancreatic amylase were both in the reference range. The cardiovascular and ophthalmologic examinations showed no pathology. The ultrasound scan revealed neither liver nor spleen enlargement, but the echogenity of both tissues was increased. Interestingly, mild enlargement of both kidneys was found, similarly to his sister (47 mm, controls 44.8 ± 0.31).

The boy is on a similar diet as his sister (0.6 g of fat/kg/day). Now, at the age of 3.5 years, his weight is 15 kg (16th percentile) and height 102 cm (24th percentile). The level of TG is 6.9 ± 3.1 mmol/l, total cholesterol 4.18 ± 0.7 mmol/l and HDL-cholesterol 0.47 ± 0.06 mmol/l.

Patient 3

The boy was born at term as a hypertrophic child with birth weight 4370 g (> 99.9th percentile) and length 58 cm (> 99.9th percentile). His mother has a normal lipid profile, the father has HC of 7.05 mmol/l (reference range < 5.2), the level of triglycerides was borderline (1.7 mmol/l; reference range < 1.7). The boy was fully breastfed for the first six months, then porridge, fruits,

vegetable puree and small portions of lean meat were added to breastfeeding. His anthropometric parameters had normalized during the first year of life; at the age of 10 months he reached 10.5 kg with a length of 73 cm.

Since the age of 2 months, the boy suffered from recurrent ear and skin infections, perianal mycosis and abdominal distension. Abdominal ultrasound revealed hepatomegaly (78 mm, controls 55.4 ± 1.06 mm) and splenomegaly (65 mm, controls 34.6 ± 0.52 mm), the size of pancreas and kidneys was normal. Ophthalmologic examination showed grey optic discs compatible with lipaemia retinalis. Echocardiography showed no pathology of the heart and coronary vessels. The laboratory analyses revealed a lactescent serum, but data of lipids were not released from the laboratory because of the effect of HTG on the results. At the age of 4 months, when the serum was 10-times diluted, the total cholesterol was 17.7 mmol/l (reference range < 4.2), TG 154 mmol/l (reference range < 2.2) and HDL-cholesterol 0.45 mmol/l (reference range 1-1.8). LDL-cholesterol and liver function tests were within the reference range.

Since the age of one year, the boy is on a low-fat diet (cereals, fruits, vegetables and lean meat) with 0.5 g of fat/kg/day. At the age of 1.5 year, his weight is 13.2 kg (79th percentile) and height 83 cm (45th percentile). The ultrasound scan showed normal size of liver and spleen; the levels of lipids have normalized (TG 2.19 mmol/l, total cholesterol 3.05 mmol/l, LDL-cholesterol 1.95 mmol/l), only HDL-cholesterol is low (0.45 mmol/l).

Ethics

Informed consent was obtained from the parents.

Methods

LPL concentration

The immunoreactive LPL concentration (mass) was measured in the serum before and 15 minutes after intravenous injection of heparin (30 IU/kg of body weight, Heparin, Léčiva™, Zentiva, Prague, Czech Republic). The samples were frozen at -70 °C and kept until analysis. LPL was analysed by a sandwich ELISA kit according to the operating instructions (Lipoprotein Lipase Elisa, ALPCO Diagnostics, Salem, NH) using anti-bovine milk lipoprotein lipase mouse monoclonal antibody coated in microtitre wells. LPL in the serum was trapped on the plate by the antigen-antibody reaction with LPL in serum samples, then reacted with antibodies. Thereafter, anti-LPL serum consisting of anti-bovine milk lipoprotein lipase chicken serum and enzyme horseradish peroxidase-labelled anti-chicken immunoglobulin G goat serum (enzyme-linked antibody) were added into the wells and incubated to initiate antigen-antibody reactions. The plates were rinsed and the peroxidase activity was measured by absorbance at 492 nm using o-phenylenediamine dihydrochloride for colour development. The reference interval of LPL mass concentration is 45–63 ng/ml in pre-heparin and 164–284 ng/ml in the post-heparin plasma. The correlation formula between plasma and serum concentration is, in compliance with the manual, N = 54, r = 0.992, y = 0.97x-1.3, showing very good concordance.

Mutation analyses

Exome sequencing was performed as described previously (Ehling et al., 2013) using 3 µg of DNA from Patients 1 and 2 and their parents. For DNA enrichment, SureSelect All Exome Kit (Agilent, Santa Clara, CA) was used according to the manufacturer's protocol. DNA sequencing was performed with the captured barcoded DNA library using SOLiD™ 4 System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) at the Institute for Inherited Metabolic Disorders (Prague, Czech Republic). Prioritized variants were confirmed by Sanger sequencing.

Sequencing of individual genes: all coding exons and adjacent intronic regions of the *LPL* gene (ENSG00000175445, NC_000008.10), *GPIHBP1* gene (ENSG00000182851), *APOA5* gene (ENSG00000110243), *APOC2* gene (ENSG00000234906) were amplified by PCR and analysed by direct sequencing in genetic analyser ABI 3500xL (Applied Biosystems). PCR primers are available upon request.

Results

The clinical and laboratory data of our children with LPL deficiency in comparison to 45 patients from the literature are summarized in Table 1 (Feoli-Fonseca et al., 1998; Pouwels et al., 2008). Our patients had a positive family history for dyslipidaemia. One child manifested since the first week of life with recurrent abdominal pain and one child with abdominal distension and hepatosplenomegaly since the second month of life. The third child (Patient 2), younger brother of Patient 1, was asymptomatic when diagnosed in the first week of life. Lipaemia retinalis and splenomegaly were present in two children, hepatomegaly in one and acute pancreatitis in one. All children had lactescent serum (Fig.1), profound HTG (124 ± 25 mmol/l; reference range < 2.2), HC (22.8 ± 7.3 mmol/l, reference range < 4.2) and low levels of HDL-cholesterol (Table 1). Two patients had normocytic anaemia; one of them required blood transfusion. Neither eruptive xanthomas nor intestinal bleeding were observed. The LPL mass concentration in pre-heparin serum samples was low only in one patient, but in all of them no significant increase of LPL mass was found after heparin injection (6.3, 5.6 and 4.6 ng/l respectively), corresponding to LPL deficiency. Inadequate increase of LPL mass after heparin injection was also found in the heterozygote mother of Patients 1 and 2; the other heterozygous parents had borderline increase of LPL mass after heparin injection (Fig. 2).

Mutation analysis

After direct sequencing of *APOC2*, *APOA5*, and *GPIHBP1* genes was negative, exome sequencing was performed in Patients 1 and 2 and their parents. Both siblings are homozygous for two variants: c.476C > G resulting in p.Ser159Thr amino acid substitution

Table 1. Clinical and laboratory data in three children with LPL deficiency in comparison to the patients' series from the literature (Feoli-Fonseca et al., 1998; Pouwels et al., 2008)

	Current report			Feoli-Fonseca et al., 1998	Pouwels et al., 2008
	Patient 1	**Patient 2**	**Patient 3**	**N = 16**	**N = 29**
Affected siblings	+	+	-	1/16	8/29
Gender (F/M)	F	M	M	F10/16	n.a.
Age of manifestation	1 week	*	2 months	< 1 y	2-43 y
Current age	6.5 years	3.5 years	15 months	n.a	n.a
Clinical data					
Irritability	+	-	+	7/16	n.a
Abdominal tenderness	+	-	+	2/16	n.a
Vomiting	-	-	+	3/16	n.a
Diarrhoea	-	-	+	1/16	n.a
Pancreatitis	+	-	-	7/16	16/29
Hepatomegaly	-	-	+	7/16	n.a
Splenomegaly	+	-	+	7/16	n.a
Eruptive xanthomas	-	-	-	3/16	2/29
Lipaemia retinalis	+	-	+	5/16	n.a
Lower intestinal bleeding	-	-	-	2/16	n.a
Laboratory data					
Triglycerides (mmol/l)	93	126	155[&]	↑ in16/16	↑ in 29/29
Total cholesterol (mmol/l)	33.1	17.6	17.7[&]	4.26 – 32.17	n.a
HDL-cholesterol (mmol/l)	0.8	0.47[Y]	0.45[&]	n.a	n.a
Hepatopathy	+	-	-	n.a	n.a
Haemoglobin < 95 g/l	+	-	+	10/16	n.a
Activity of LPL (ng/ml)[£]	4.6	5.6	6.4	n.a	n.a

n.a. – not available , * – younger brother of Patient 1 was asymptomatic when diagnosed at the age of 5 days, Y – on the diet, & – at the age of 4 months, £ – activity of lipoprotein lipase (LPL) expressed as the difference between pre- and post-heparin LPL mass (controls 119–220).

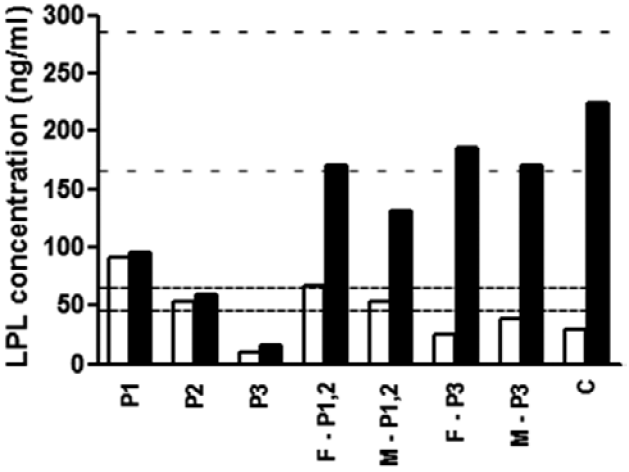


Fig. 2. LPL immunoreactive mass in pre-heparin □ and post-heparin ■ serum in three children with LPL deficiency (P1, P2, P3) compared to their parents.
F - P1,2: father of Patients 1 and 2; **M - P1,2**: mother of Patients 1 and 2; **F - P3**: father of Patient 3; **M - P3**: mother of Patient 3. **C**: healthy control. The reference range interval for pre-heparin plasma LPL mass -------- is 45-63 ng/ml, for the post-heparin plasma - - - - 164-284 ng/ml.

and c.1421C > G ending up in an early stop codon p.Ser474Term. The first mutation has not yet been described, the second variant c.1421C > G resulting in two amino acid shorter LPL protein occurs in 12 % of European alleles. Although both of the parents are heterozygous carriers for both of the mutations *in cis*, consanguinity was not confirmed. We performed genetic counselling in the family and offered prenatal diagnosis.

The *LPL* gene was sequenced in Patient 3. Two heterozygous mutations were found in exon 6: a heterozygous mutation c.604G > A resulting in amino acid substitution p.Asp202Asn, and c.698A > G resulting in amino acid substitution p.Tyr233Cys. None of these mutations has been described previously according to HGMD® Professional 2013.4 Database. Both mutations have been evaluated as pathogenic by *in silico* analysis (MutationTaster, PolyPhen2, Sift). Each of the parents is a carrier of one of these mutations.

Discussion

Three children with LPL deficiency due to three novel mutations in the *LPL* gene and early clinical manifestation during the first weeks of life are described. LPL

deficiency causes hyperchylomicronaemia (not routinely measured in our institution) and HTG (typically > 11.3 mmol/l) that leads to milky-cream appearance of the plasma (Rahalkar et al., 2009). All our patients had profound HTG (124.4 ± 25.2 mmol/l) at the time of diagnosis. As LPL is also involved in other lipoprotein metabolism, the decreased HDL-cholesterol level < 0.5 mmol/l may contribute to the unfavourable lipid profile in patients with LPL deficiency (Brunzell and Bierman, 1982; Santamarina-Fojo, 1998). All our patients had low HDL-cholesterol (0.42 ± 0.02 mmol/l). It may be of importance that the low HDL-cholesterol in our patients persisted even after long-standing dietary interventions with good compliance.

The severity of clinical symptoms seems to be proportional to the level of TG; however, asymptomatic cases with massive HTG up to 327 mmol/l were described (Brunzell et al., 1995). Therefore, LPL deficiency can be sometimes recognized only accidentally by the milky-cream appearance of the plasma or serum.

The onset of clinical symptoms in patients with LPL deficiency may vary substantially since neonatal period to adulthood (Pouwels et al., 2008; Pugni et al., 2014). The first symptoms are usually not specific (Brunzell et al., 1995; Önal et al., 2007). In childhood, recurrent attacks of abdominal pain, failure to thrive, nausea, anorexia, fever, diarrhoea and vomiting are most common (Levy and Rifkind, 1973). Neither failure to thrive nor diarrhoea was present in our patients. LPL deficiency, especially in small infants, may mimic the episodes of infantile colic or a simple abdominal tenderness, which may or may not be caused by ongoing pancreatitis. The risk for pancreatitis becomes especially apparent when the concentration of TG exceeds 10 mmol/l (Yuan et al., 2007). In our patients, recurrent abdominal pain was present in two cases and acute pancreatitis in one case. In 45 patients described by Feoli-Fonseca et al. (1998) and Pouwels et al. (2008), pancreatitis was recognized in 41 % of cases. Eruptive xanthomas, the typical yellowish skin lesions arising from foam cell deposition in patients with HTG > 22.5 mmol/l (Rahalkar et al., 2009), were not observed in our patients, although their TG levels were even higher. The 11% incidence of eruptive xanthomas in patients described by Feoli-Fonseca et al. (1998) and Pouwels et al. (2008) may indicate that long-term HTG is probably necessary for their development.

Fundoscopic examination in two of our patients revealed whitish retinal veins compatible with lipaemia retinalis. This symptom may easily be overlooked, because it is initially visible only at the retinal periphery (Zahavi et al., 2013). With increasing level of TG (> 45 mmol/l) the whole retina becomes affected and gets a salmon colour (Brunzell et al., 2001). Both liver and spleen are the target organs of lipid storage resulting in hepatosplenomegaly. Splenomegaly was present in two and hepatomegaly in one of our patients. It is worth mentioning that in our patient siblings, the enlargement of kidneys was also found, which to our best knowledge has not been described so far.

A common symptom in LPL deficiency is normocytic anaemia resulting from occult intestinal blood losses (Feoli-Fonseca et al., 1998). It has been suggested that haemolysis due to the changes in lipid composition of the erythrocyte membrane may also play an important role (Frohlich and Godin, 1986; Cantin et al., 1995). In agreement with published data, anaemia was present in two of our patients, and blood transfusion was necessary in one of them. Hyperchylomicronaemia may increase blood viscosity. Consequently, a decreased blood supply can cause a local ischaemia. Encephalopathy with convulsions or lower intestinal bleeding with bloody diarrhoea by disrupting blood circulation was described as rare symptoms in LPL-deficient patients (Simons et al., 1980; Ameis et al., 1991; Black and Sprecher, 1993; Önal et al., 2007). Intestinal bleeding did not develop in our patients and it was not common in the group of patients described by Feoli-Fonseca et al. (1998).

Mutations analyses in the LPL gene

The *LPL* gene comprises 10 exons and encodes a 448 amino acid long protein (Rahalkar et al., 2009). So far, more than 200 mutations were reported in patients with LPL deficiency. The majority of them are missense mutations in exons 5 and 6 encoding amino acids in the catalytically active site, TG-binding site and structurally relevant disulphide bridges (van Tilbeurgh et al., 1994, HGMD® Professional 2013.4 Database). Exome sequencing of our patient siblings revealed the presence of two homozygous mutations in the *LPL* gene. Mutation c.476C > G leads to substitution of serine to threonine in position 159. Ser^{159} is part of the 'catalytic triad' (three amino acids forming the catalytic centre of the LPL enzyme) and is highly conserved among species. Although serine and threonine are both polar amino acids, threonine is slightly larger and may affect conformation of the enzyme active site (Wang et al., 2013).

The second mutation/polymorphism (12% frequency in European alleles) is quite interesting, probably underlying the different biochemical phenotypes in our families. Mutation c.1421C > G causes an early stop codon on p.Ser474 (S447X) compared to the regular termination codon at position 476. At the mRNA level, the nucleotide substitution results in decreased susceptibility to translational inhibition (Ranganathan et al., 2012) and increased amount of LPL protein. In otherwise healthy carriers, the *LPL* S447X gene variant has been associated with a favourable lipid profile. The studies of gene therapy with the S447X variant in rodent models were promising in its therapeutic and protective value (Ross et al., 2004, 2005). However, this issue still remains a matter of debate as in compound heterozygotes for the S447X variant and loss-of-function mutation in the *LPL* gene, the S447X variant did not protect against HTG (Hegele et al., 2006). Although its presence leads to higher amounts of LPL in pre-heparin plasma, this released pool has altered activity and hence is not protective (Wang et al., 2007; Surendran et al., 2012).

Both of the parents are carriers of both these mutations *in cis* (c.[476C>G, 1421C>G];[=]), but they differ in laboratory results. Only part of heterozygotes with one defective allele of the *LPL* gene develop HTG. It is expected that half-normal LPL activity suffices for proper maintaining of a normal TG fasting concentration and additional genetic or environmental factors result in elevation of TG plasma levels (Hölzl et al., 2000). However, lipid metabolism is very complex and these additional factors may influence the levels of LPL itself. This may explain why the mother presented with post-heparin serum LPL masses that did not reach the upper reference interval (Fig. 2, M - P1,2). Since all the family of the mother's side have HTG, we searched for these possible supplementary causes of dyslipidaemia. It has been shown that the cumulative influence of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in important genes including *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *GPIHBP1*, *APOE2* and *APOB* may participate in HTG (Johansen and Hegele, 2011). Besides causing mutations in our patients mentioned above, there were no SNPs in the *LPL* gene. In addition, direct sequencing did not prove any polymorphism in the *APOC2*, *APOE*, *AOPA5* or *GPIHBP1* genes. In the *APOA5* gene, which encodes lipoprotein Apo A-V correlating with plasma values, we found a combination of polymorphisms that forms the common haplotype ApoA5*1. Nevertheless, this haplotype is not associated with HTG (Moreno-Luna et al., 2007). Our results did not allow us to explain the differences in lipid values of the parents; other mechanisms must play a role.

Patient 3 is a compound heterozygote for two novel missense mutations c.604G > A (p.Asp202Asn) and c.698A > G (p.Tyr233Cys). These mutations change amino acids Asp^{202} and Tyr^{233} localized in the highly conserved "central homology region" in close proximity to the catalytic site of LPL (Reina et al., 1992). Exchange of Tyr^{233} into Asp has been described in a patient with HTG (Evans et al., 2011).

Differential diagnostics

In children, fasting chylomicronaemia with extreme HTG may be caused by several factors. Most commonly, HTG is a complex result of both accumulated genetic variants and environmental factors including imbalance between caloric intake and expenditure, alcohol consumption, various diseases (obesity, renal failure, hypothyroidism, type 2 diabetes) or medications with corticosteroids, oestrogens, retinoids or β-blockers (Ballantyne et al., 2000; Yuan et al., 2007). We have already mentioned the role of SNPs involved in the lipid metabolism. Exceptionally, severe HTG is caused by monogenic disorders resulting from loss-of-function mutations in *LPL*, *APOC2*, *APOA5*, *LMF1* or *GPIHBP1* genes (Hegele, 2009; Johansen et al. 2011). Unlikely to combined HTG, these monogenic HTG usually develop already in childhood.

Although Apo C-II deficiency may also be considered as a functional deficiency of LPL taking into account the fact that biochemical and clinical phenotypes are similar (Rahalkar et al., 2009), this disorder can be recognized by addition of artificial Apo C-II to the post-heparin plasma samples. Approximately 10 mutations in the *APOC2* gene have been found in patients with familial chylomicronaemia (Connelly et al., 1987). HTG may be present in patients homozygous for mutations in *APOA5*. Apo A-V plays a focal role in hydrolysis of TG-rich lipoproteins by enhancing LPL activity (Charlton-Menys and Durrington, 2005). An extremely rare primary cause of chylomicronaemia is a mutation of the lipase maturation factor 1 (*LMF1*) gene. This gene encodes a transmembrane protein with an evolutionarily conserved domain localized in the endoplasmic reticulum and it has been suggested that it is responsible for the post-translational maturation of nascent lipase polypeptides to fully functional forms (Briquet-Laugier et al., 1999). Patients homozygous for the loss-of-function mutation in the *LMF1* gene have low expression of both LPL and hepatic lipase resulting in combined lipase deficiency (Paterniti et al., 1983; Reue and Doolittle, 1996; Peterfy et al., 2006). This disorder is responsible for extreme HTG, which may cause high blood viscosity and ischaemia (Peterfy et al., 2007). A few probands with chylomicronaemia are characterized by the presence of an endogenous circulating LPL inhibitor. These patients have extremely high LPL levels (Davignon and Dufour, 2007) and the protein function (activity) is normal. Last but not least, the discovery of glycosylphosphatidylinositol anchored-HDL-binding protein 1 (GPIHBP1) needed for integration of LPL to the endothelium surface showed that these capillary endothelial cells are not simply the passive hosts of lipolysis, but rather active participants in the lipolytic process (Beigneux et al., 2009).

Genetic variability is due to the diversity of the LPL complex in the endothelium, which includes numberless important components. In the present report we tried to summarize the most important genes and their roles in TG metabolism. This genetic basis is giving us a new perspective for distinguishing HTG phenotypes rather than a strictly biochemical approach. A variable combination of genetic mutations mentioned above is therefore responsible for hyperlipoproteinaemias classified in the Fredericson scheme (Fredericson, 1971).

Methodological notes

Reliable diagnosis of LPL deficiency requires either a post-heparin serum/plasma LPL assay or DNA analysis of the *LPL* gene (Rahalkar et al., 2009). LPL is an enzyme that binds to the endothelial surface by heparan sulphate, which is the reason why intravenous heparin elutes LPL from the endothelium to the plasma where it can be assayed (Brunzell et al., 1995). Only the mass attached to the endothelium is catalytically active (Auwerx, 1989; Brunzell et al., 1995; Hayden and Henderson, 1999). Therefore, a difference between pre- and post-heparin LPL mass reflects the enzyme activity.

A small amount of LPL is constantly present in the plasma and it has been shown that its majority consists

of inactive monomeric LPL acting as a ligand for liver receptors and cell surfaces (Williams et al., 1992). Although this pre-heparin, catalytically non-active LPL varies during the day due to food consumption, it can also be influenced by lipid-lowering agents (Totsuka et al., 2000). Lipoprotein lipase ELISA test only detects the non-denatured dimeric form of the enzyme, and therefore no alteration of inactive LPL can disturb the measurement of active LPL, which is minimally present in the plasma of normal patients as well.

Measuring the mass of LPL is a standard method for diagnosing LPL deficiency. Although LPL activity is also measured, particularly in experimental settings, quantitative determination of LPL mass is a diagnostic approach in the majority of cases. However, in some very rare cases, LPL mass could be normal regardless of its low activity resulting in false negative results of the test. Especially mutations in the *APOC2* gene encoding the important cofactor of LPL may cause this discrepancy. The addition of artificial APOC2 to the test would be necessary for the correct diagnosis (Rahalkar et al., 2009).

In our study, the LPL immunoreactive mass in the pre-heparin serum was low only in one patient, but as already mentioned, the pre-heparin LPL mass might be influenced by additional environmental or genetic factors, and hence is not convenient for the diagnostics of LPL deficiency. On the contrary, in agreement with the diagnosis, the post-heparin release of the LPL immunoreactive mass was very low in all patients. Interestingly, in their parents, all molecularly confirmed heterozygotes for LPL deficiency, the post-heparin release of the LPL immunoreactive mass was low only in one of four, suggesting that biochemical analyses in the affected families are not feasible for identification of heterozygotes.

Dietary interventions and treatment

Low-fat diet (0.5–0.7 g/kg of body weight) recommended in patients with LPL deficiency is usually sufficient for the proper growth in childhood. Oils containing medium-chain fatty acids can be used as a source of fat as they do not rely on CM formation (Rouis et al., 1997). In addition, supplementation with essential free fatty acids and lipid-soluble vitamins is advisable (Press et al., 1974). In small children, frequent feeding is necessary to avoid lipolysis.

Pharmacotherapy plays a less important role, because the lipid-lowering drugs usually up-regulate LPL activity, and therefore their TG-lowering effect is low (Rahalkar et al., 2009). Although LPL deficiency as a monogenic disorder seems to be a perfect candidate for gene therapy, its high price makes it hardly accessible. Alipogene tiparvovec (Glybera®), using a functional copy of LPL, has been recently approved by the European Commission (Haddley, 2013, http://www.uniqure.com), but its cost would make it probably the most expensive drug on the market (http://www.bionews.org).

Conclusion

Although very rare, the LPL deficiency must be considered in neonates and young infants with abdominal pain and HTG because its early treatment might prevent development of life-threatening acute pancreatitis.

References

Ameis, D., Kobayashi. J., Davis R. C., Ben-Zeev, O., Malloy, M. J., Kane, J. P. (1991) Familial chylomicronemia (Type I hyperlipoproteinemia) due to a single missense mutation in the lipoprotein lipase gene. *J. Clin. Invest.* **87**, 1165-70.

Auwerx, J. H., Babirak, S. P., Fujimoto, W. Y., Iverius, P.-H., Brunzell, J. D. (1989) Defective enzyme protein in lipoprotein lipase deficiency. *Eur. J. Clin. Invest.* **19**, 433-437.

Ballantyne, C. M., Grundy, S. M., Oberman, A. (2000) Hyperlipidemia: diagnostic and therapeutic perspectives. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85**, 2089-2112.

Beigneux, A. P., Weinstein, M. M., Davies, B. S. J., Gin, P., Bensadoun, A., Fong, L. G., Young, S. G. (2009) GPIHBP1 and lipolysis: an update. *Curr. Opin. Lipidol.* **20**, 211-216.

Black, D. M., Sprecher, D. L. (1993) Dietary treatment and growth of hyperchylomicronemic children severely restricted in dietary fat. *Am. J. Dis. Child.* **147**, 60-62.

Briquet-Laugier, V., Ben-Zeev, O., White, A., Doolittle, M. H. (1999) *cld* and *lec23* are disparate mutations that affect maturation of lipoprotein lipase in the endoplasmic reticulum. *J. Lipid. Res.* **40** 2044-2058.

Brunzell, J. D., Bierman, E. L. (1982) Chylomicronemia syndrome. Interaction of genetic and acquired hypertriglyceridemia. *Med. Clin. North Am.* **66**, 455-468.

Brunzell, J. (1995) Familial lipoprotein deficiency and other causes of the chylomicronemia syndrome. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 7th ed., eds. Brunzell J., Scriver, C., Baudet, A., Sly, W., Valle, D., pp. 1913-1932, McGraw-Hill, New York.

Brunzell, J. D., Deeb, S. S. (2001) Familial lipoprotein lipase deficiency, Apo C-II deficiency, and hepatic lipase deficiency. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease,* 8th ed., eds. Scriver, C. R., Beadet, A. L., Sly, W. S., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., pp. 2789-2816, McGraw-Hill, New York.

Cantin, B., Boudriau, S., Bertrand, M., Brun, L. D., Gagné, C., Rogers, P. A. (1995) Hemolysis in primary lipoprotein lipase deficiency. *Metabolism* **44**, 652-658.

Charlton-Menys, V., Durrington, P. N. (2005) Apolipoprotein A5 and hypertriglyceridemia. *Clin. Chem.* **51**, 295-297.

Connelly, P. W., Maguire G. F., Little, J. A. (1987) Apolipoprotein CII St. Michael. Familial apolipoprotein CII deficiency associated with premature vascular disease. *J. Clin. Invest.* **80**, 1597-1606.

Davignon, J., Dufour, R. (2007) *Primary Hyperlipidemias: an Atlas of Investigation and Diagnosis.* Clinical Publishing, Oxford, UK.

Ehling, R., Nosková, L., Stránecký, V., Hartmannová, H., Přistoupilová, A., Hodaňová, K., Benke, T., Kovacs, G. G., Ströbel, T., Niedermüller, U., Wagner, M., Nachbauer, W., Janecke, A., Budka, H., Boesch, S., Kmoch, S. (2013) Cerebellar dysfunction in a family harboring the PSEN1

mutation co-segregating with a cathepsin D variant p.A58V. *J. Neurol. Sci.* **326**, 75-82.

Evans, D., Arzer, J., Aberle, J., Beil, F. U. (2011) Rare variants in the lipoprotein lipase (LPL) gene are common in the hypertriglyceridemia but rare in Type III hyperlipidemia. *Atherosclerosis* **214**, 386-390.

Evans, V., Kastelein, J. J. P. (2003) Mini-symposium: Lipid and protein disorders: Biochemistry and molecular genetics. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **16**, 283-287.

Frederickson, D. S. (1971) An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Ann. Intern. Med.* **75**, 471-472.

Frohlich, J., Godin, D. V. (1986) Erythrocyte membrane alterations and plasma lipids in patients with chylomicronemia and in Tangier disease. *Clin. Biochem.* **19**, 229-34.

Gagne, C., Brun, L. D., Julien, P., Moorjani, S., Lupien, P. J. (1989) Primary lipoprotein-lipase-activity deficiency: clinical investigation of French Canadian population. *CMAJ*, **140**, 405-411.

Haddley, K. (2013) Alipogene tiparvovec for the treatment of lipoprotein lipase deficiency. *Drugs Today (Barc.)* **49**, 161-170.

Hayden, M., Henderson, H. E. (1999) The molecular biology and genetics of human lipoprotein lipase. In: *Lipoproteins in Health and Disease.* eds. Betterige, D. J., Illingworth, D. R., Shepherd, J., pp. 247-260, Oxford University Press, London.

Hegele R. A. (2006) Gene therapy with lipoprotein lipase variant S447X. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 25-28.

Hegele R. A. (2009) Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat. Rev. Genet* **10**, 109-121.

Hölzl, B., Kraft, H. G., Wiebusch, H., Sandhofer, A., Patsch, J., Sandhofer, F., Paulweber, B. (2000) Two novel mutations in the lipoprotein lipase gene in a family with marked hypertriglyceridemia in heterozygous carriers. Potential interaction with the polymorphic marker D1S104 on chromosome 1q21-q23. *J. Lipid Res.* **41**, 734-741

Johansen, C. T., Hegele, R. A. (2011) Genetic bases of hypertriglyceridemic phenotypes. *Curr. Opin. Lipidol.* **22**, 247-253.

Johansen, C.T., Kathiresan, S., Hegele, R. A. (2011) Genetic determinants of plasma triglycerides. *J. Lipid. Res.* **52**, 189-206.

Levy, R. I., Rifkind, B. M. (1973). Diagnosis and management of hyperlipoproteinemia in infants and children. *Am. J. Cardiol.* **31**, 547-556.

Moreno-Luna, R., Perez-Jimenez, F., Marin, C., Perez-Martinez, P., Gomez, P., Jimenez-Gomez, Y., Delgado-Lista, J., Moreno, J. A., Tanaka, T., Ordovas, J. M., Lopez-Miranda, J. (2007) Two independent apolipoprotein A5 haplotypes modulate postprandial lipoprotein metabolism in a healthy Caucasian population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2280-2285.

Önal, H., Aktuglu-Zeybek, C., Alhaj, S., Altun, G. (2007). Encephalopathy in Type I hyperlipidemia. *Indian Pediatr.* **44**, 306-308.

Paterniti, J. R. Jr, Brown, W. V., Ginsberg, H. N., Artzt, K. (1983) Combined lipase deficiency (cld): a lethal mutation on chromosome 17 of the mouse. *Science* **221**, 167-169.

Peterfy, M., Mao, H. Z., Doolittle, M. H. (2006) The *cld* mutation: narrowing the critical chromosomal region and selecting candidate genes. *Mamm. Genome* **17**, 1013-1024.

Peterfy, M., Ben-Zeev, O., Mao, H. M., Wissglas-Volkov, D., Aouizerat, B., E., Pullinger, C., R., Frost, P. H., Kane, J. P., Malloy, M. J., Reue, K., Pajukanta, P., Doolittle, M. H. (2007) Mutations in *LMF1* cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat. Genet.* **39**, 1483-1487.

Pouwels, E. D., Blom, D. J., Firth, J. C., Henderson, H. E., Marais, A. D. (2008) Severe hypertriglyceridemia as a result of familial chylomicronaemia: the Cape Town experience. *SAMJ* **2**, 105-108.

Press, M., Hartop, P. J., Prottey, C. (1974) Correction of essential fatty-acid deficiency in man by the cutaneous application of sunflower-seed oil. *Lancet* **1**, 597-598.

Pugni, L., Riva, E., Pietrasanta, C., Rabacchi, C., Bertolini, S., Pederiva, C., Mosca, F., Calandra, S. (2014) Severe hypertriglyceridemia in a newborn with monogenic lipoprotein lipase deficiency: an unconventional therapeutic approach with exchange transfusion. *JIMD Rep.* **13**, 59-64.

Rahalkar, A. R., Giffen, F., Har, B., Ho, J., Morrison, K. M., Hill, J., Wang, J., Hegele, R. A., Joy, T. (2009) Novel *LPL* mutations associated with lipoprotein lipase deficiency: two case reports and a literature review. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **87** 151-160.

Ranganathan, G., Unal, R., Pokrovskaya, I. D., Tripathi, P., Rotter, J. I., Goodarzi, M. O., Kern, P.A. (2012) The lipoprotein lipase (LPL) S447X gain of function variant involves increased mRNA translation. *Atherosclerosis* **221**, 143-147.

Reina, M., Brunzell, J. D., Deeb, S. S. (1992) Molecular basis of familial chylomicronemia: mutations in the lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II genes. *J. Lipid. Res.* **33**, 1823-1832.

Reue, K., Doolittle, M. H. (1996) Naturally occurring mutations in mice affecting lipid transport and metabolism. *J. Lipid. Res.* **37**, 1387-1405.

Rouis, M., Dugi, K. A., Previato, L., Patterson, A. P., Brunzell, J. D., Brewer, H. B., Santamarina-Fojo, S. (1997) Therapeutic response to medium-chain triglycerides and ω-3 fatty acids in a patient with the familial chylomicronemia syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 1400-1406.

Ross, C. J., Twisk, J., Meulenberg, J. M., Liu, G., van den Oever, K., Moraal, E. (2004) Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL(S447X) beneficial mutation. *Hum. Gene Ther.* **15**, 906-919.

Ross, C. J., Liu, G., Kuivenhoven, J. A., Twisk, J., Rip, J., van Dop, W. (2005) Complete rescue of lipoprotein lipase-deficient mice by somatic gene transfer of the naturally occurring LPLS447X beneficial mutation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2143-2150.

Santamarina-Fojo, S. (1998). The familial chylomicronemia syndrome. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **27**, 551-567.

Siafakas, C. G., Brown, M. R., Miller, T. L. (1999) Neonatal pancreatitis associated with familial lipoprotein lipase deficiency. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **29**, 95-98.

Simons, L. A., Grigor, W., Martin, H. C. O., Gibson, J. C., Gunn, A. P. (1980) Type I hyperlipoproteinaemia and recurrent scrotal pain. *Aust. NZ J. Med.* **10**, 336-339.

Surendran, R. P., Visser, M. E., Heemelaar, S., Wang, J., Peter, J., Defesche, J. C., Kuivenhoven, J. A., Hosseini, M., Peterfy, M., Kastelein, J. J., Johansen, C. T., Hegele, R. A., Stroes, E. S., Dallinga-Thie, G. M. (2012) Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia. *J. Intern. Med.* **272**, 185-196.

Totsuka, M., Miyashita, Y., Ito, Y., Watanabe, H., Murano, T., Shirai, K. (2000) Enhancement of preheparin serum lipoprotein lipase mass by bezafibrate administration. *Atherosclerosis* **153**, 175-179.

van Tilbeurgh, H., Roussel, A., Lalouel, J. M., Cambillau (1994) Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J. Biol. Chem.* **269**, 4626-4633.

Wang, J., Cao, H., Ban, M. R., Kennedy, B. A., Zhu, S., Anand, S., Yusuf, S., Pollex, R. L., Hegele, R. A. (2007) Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2450-2455.

Wang, Z., Li, S., Sun., L., Fan, J., Liu, Z. (2013) Comparative analyses of lipoprotein lipase, hepatic lipase, and endothelial lipase, and their binding properties with known inhibitors. *PLoS One* **8**, 1-15.

Williams, K. J., Fless, G. M., Petrie, K. A., Snyder, M. L., Brocia, R. W., Swenson, T. L. (1992) Mechanism by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein (a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins: roles for low density lipoproteins receptors and heparan sulphate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **267**, 13284-13292.

Yuan, G., Al-Shali, K. Z., Hegele, R. A. (2007). Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ* **176**, 1113-1120.

Zahavi, A., Snir, M., Kella, Y. R. (2013) Lipemia retinalis: case reports and review of the literature. *J. AAPOS* **17**, 110-111.

Supplement 13]

Ondruskova, N., Honzik, T., ***Kolarova, H.****, Pakanova, Z., Mucha, J., Zeman, J., Hansikova, H.*

Aberrant ApoC-III glycosylation in glycogen storage diseases Type III and IX.

Metab Clin Exp 2018 82, 135–141.

Metabolism Clinical and Experimental 82 (2018) 135–141

Contents lists available at ScienceDirect

Metabolism Clinical and Experimental

journal homepage: www.metabolismjournal.com

Aberrant apolipoprotein C-III glycosylation in glycogen storage disease type III and IX

Nina Ondruskova [a], Tomas Honzik [a], Hana Kolarova [a], Zuzana Pakanova [b], Jan Mucha [b], Jiri Zeman [a], Hana Hansikova [a,*]

[a] Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 12808 Prague 2, Czech Republic
[b] Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Dubravska cesta 9, 84538 Bratislava, Slovak Republic

ARTICLE INFO

Article history:
Received 1 June 2017
Accepted 17 January 2018
Available online xxxx

Keywords:
Apolipoprotein C-III
Glycogen storage disorders
O-glycosylation
Diagnostic marker
Hypertriglyceridemia

ABSTRACT

Introduction: Apolipoprotein C-III (ApoC-III) is a mostly liver-derived serum O-glycoprotein, which is used, along with an N-glycoprotein transferrin (TF), as a marker in the biochemical screening for congenital disorders of glycosylation (CDG). However, it is increasingly evident that secondary glycosylation abnormalities might occur in other, non-CDG metabolic diseases.
Material and Methods: Here we examined the glycosylation status of serum TF and Apo-CIII by isoelectric focusing, SDS-PAGE and MALDI TOF mass spectrometry in our group of 24 patients with various types of glycogen storage disorders (GSD; types 0, Ia, non-Ia, III and IX).
Results: While in GSD types Ia and non-Ia we found variable and mild ApoC-III hyposialylation, GSD types III and IX showed significantly aberrant ApoC-III glycosylation with a characteristic relative increase of its aglycosylated form. No correlation was found between ApoC-III sialylation and triglyceridemia within the analyzed group.
Conclusions: Due to a lack of an enzymatic assay for GSD type III and a certain unreliability of the assay for GSD type IX, our finding could help clinicians in differential diagnosis to better target and select appropriate genetic analysis for the suspected patients. We hypothesize that the detected profound ApoC-III hypoglycosylation in these two disorders results from reduced availability of the nucleotide-monosaccharides, specifically UDP-GalNAc, in the corresponding glycosylation reactions.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Apolipoprotein C-III (ApoC-III) is an abundant serum mucin-type O-glycoprotein, occurring in three forms with different sialic acid content: disialo- ($ApoC\text{-}III_2$), monosialo- ($ApoC\text{-}III_1$) and asialoapolipoprotein C-III ($ApoC\text{-}III_0$). Analysis of its glycosylation status, along with that of serum N-glycoprotein transferrin (TF), is routinely used in screening for congenital disorders of glycosylation (CDG) [1]. CDG form a clinically heterogeneous group of rare metabolic diseases caused by deficiencies of enzymes/proteins participating in glycosylation pathways. To this date, >100 different types of CDG have been described [2], caused by defects in i) genes involved in the biosynthesis and translocation of donor substrates, ii) genes encoding glycosyltransferases/glycosidases or proteins which determine their localization and iii) genes affecting Golgi homeostasis. Clinically, the symptoms usually appear in early infancy, and often involve psychomotor retardation, failure to thrive, hepatopathy and coagulopathy. Hormonal changes, skin and skeletal abnormalities or dysmorphia are also common, depending on the CDG type; however, even individuals with the same CDG type might have very different phenotypes. Hyposialylated ApoC-III has been detected in a number of CDG types such as the deficiency of CMP-sialic acid transporter SLC35A1 [1], the subunits of vacuolar H+ -ATPase (e.g., ATP6V0A2 [3]) or various COG (Conserved Oligomeric Golgi) subunits [4–9]. Due to the multi-systemic, non-specific and extremely variable clinical manifestation of CDG syndromes, an accurate biochemical analysis is crucial for a correct diagnosis.

However, several studies have reported complex dysregulation of plasma glycoprotein glycosylation in various unrelated, non-CDG metabolic diseases, such as type 2 diabetes, metabolic syndrome,

Abbreviations: ApoC-III, apolipoprotein C-III; CDG, congenital disorders of glycosylation; ChE, cholinesterase; CMP-NeuAc, cytidine monophosphate *N*-acetylneuraminic acid; Glc-1-P, glucose-1-phosphate; Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GSD, glycogen storage disorders; NeuAc, *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid); PGM1-CDG, phosphoglucomutase 1 deficiency; TAG, triacylglycerols; Thr, threonine; TF, transferrin; UDP-Glc, uridine diphosphate glucose; UDP-Gal, uridine diphosphate galactose; UDP-GalNAc, uridine diphosphate *N*-acetylgalactosamine.

* Corresponding author.
E-mail addresses: nina.ondruskova@lf1.cuni.cz (N. Ondruskova), tomas.honzik@lf1.cuni.cz (T. Honzik), hana.kolarova@lf1.cuni.cz (H. Kolarova), zuzana.pakanova@savba.sk (Z. Pakanova), Jan.Mucha@savba.sk (J. Mucha), jzem@lf1.cuni.cz (J. Zeman), hana.hansikova@lf1.cuni.cz (H. Hansikova).

https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.004
0026-0495/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

malnutrition, rheumatic diseases, IgA nephropathy (IgAN) or Prader-Willi syndrome [10–15]. The causes for the observed secondary glycosylation abnormalities remain largely unexplained and are likely specific for each condition, but, as a general rule, a greater extent of metabolic derangement tends to be associated with more prominent glycosylation disturbances. Specifically, the sialylation of ApoC-III was assessed in metabolic syndrome, where it was found to be reduced [11], while the opposite trend was revealed in the analysis of samples from patients with chronic liver disease (including hepatitis C), who manifested a significantly increased ratio of ApoC-III_2 to ApoC-III_1 [16]. Some years ago, aberrant TF glycosylation was found in phosphoglucomutase 1 (PGM1) deficiency (OMIM: 614921), a monogenic metabolic disease originally labelled as glycogen storage disorder (GSD) type XIV [17], which led to its novel classification as a congenital disorder of glycosylation (PGM1-CDG) [18]. Glycogen storage disorders are a group of rare inborn defects in glycogen metabolism that are characterized by a histological finding of a cellular depletion of glycogen molecules, or their accumulation with either a normal or abnormal structure. GSD types are mostly denoted by Roman numerals and are further subdivided based on the causative genes, the affected tissue (muscle, liver or both), and the onset of the disease [19]. Clinically, the majority of patients with GSD show exercise intolerance, hypotonia or muscle cramps, while hepatic involvement typically manifests itself with hepatomegaly and episodes of hypoglycemia. In addition to fasting hypoglycemia, laboratory abnormalities often include lactic acidosis, hyperlipidemia (particularly hypertriglyceridemia), hyperuricemia, increased creatine kinase and hepatic transaminases [20]. Diagnostics of individual GSD types is based on clinical suspicion, followed by corresponding enzymatic tests (for GSD types IV, VI and IX) to help navigate the consequent genetic analysis. However, GSD types VI and IX and known to be elusive to biochemical assays, as the patients often show normal results, which complicates a correct diagnosis [21–25]. In PGM1-CDG, the detected aberrant TF profile had a distinct pattern, different from the pathological TF patterns standardly observed in positive samples from CDG screening (type I or II, depending on which sialylated TF isoforms are relatively reduced), and was designated as type I/II. The hypoglycosylation in PGM1-CDG is thought to be caused by increased UDP-Glc to UDP-Gal ratio, i.e., the decreased availability of activated galactose as a substrate for galactosylation reactions [26]. Galactose supplementation in these patients was shown to not only normalize glycosylation and other laboratory parameters, but also lead to clinical improvement [27,28].

The aim of this study was to examine N-/O-glycosylation of serum TF and ApoC-III in our group of patients with various types of confirmed glycogen storage disorders to determine whether there is a broader biochemical overlap between the CDG and GSD syndromes.

2. Material and Methods

2.1. Patients and Material

The analyzed group consisted of patients (labelled as P1–P24) enzymatically and/or genetically diagnosed with various types of glycogen storage diseases (total: n = 24; 2× type 0 (OMIM: 240600), 7× Ia (OMIM: 232200), 3× non-Ia (OMIM: 232220), 7× III (OMIM: 232400), 5× IX (OMIM: 306000); multiple samples were taken from some individual patients, totalling 39 samples), two subjects with hypertriglyceridemia due to familial lipoprotein lipase (LPL) deficiency (OMIM: 238600) and one individual with hypertriglyceridemia of unknown origin; selected clinical and laboratory data are available in Table 1. All of the GSD patients were on standard treatment (see Appendix). Blood was obtained from the tested patients with informed consent from each participant or their parents. Serum was separated by centrifugation (630*g*, 10 min) and stored at −20 °C until analysis.

2.2. Analysis of ApoC-III and TF by Isoelectric Focusing (IEF) and Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

IEF of ApoC-III and Western blotting was carried out as described previously [29]. IEF of TF and SDS-PAGE of ApoC-III was performed according to Wopereis et al. [30]. Neuraminidase treatment of ApoC-III in a control sample was performed by mixing 4 μl of serum with 1 μl of neuraminidase (Roche, 11585886001, 10 U/ml), followed by overnight incubation at laboratory temperature. The acquired profiles of the proteins' glycosylated isoforms were quantified densitometrically using AlfaDigiDoc (Alpha Innotech) for TF and Quantity One (Bio-Rad) for ApoC-III. TF glycosylated profiles were labelled as normal, borderline or pathological according to our laboratory's internal reference range that was determined for the method (see Appendix Table A.1). ApoC-IIIprofiles from the IEF analysis were evaluated as follows: when the relative amounts of all three sialylated isoforms were within the reference range, they were labelled as normal; when either ApoC-III_1 or ApoC-III_0 was relatively increased, they were labelled as borderline; when ApoC-III_1 and/or ApoC-III_0 was relatively increased and, at the same time, ApoC-III_2 was relatively decreased, they were labelled as pathological. Sex and age of the tested individuals were also taken into consideration while evaluating the sample (the reference ranges for different sex and age categories were determined in our previous study [29]).

2.3. Analysis of ApoC-III by MALDI TOF Mass Spectrometry (MS)

Mass spectrometry analysis of ApoC-III glycan structures in the serum samples was performed as described previously [31]. Briefly, a 2.5 μl aliquot of serum was dissolved in 50 μl of 0.1% (V/V) trifluoroacetic acid (TFA) to disassemble the lipoprotein complexes. After shaking the solution for 15 min, samples were desalted by solid phase extraction (SPE) using ZipTipC18 (Milipore) and the proteins were eluted with 0.1% TFA (V/V) and 70% (V/V) acetonitrile solution. 1 μl of eluate was premixed on a ground steel target plate (Bruker Daltonics) with 1 μl of 20 mg/ml of 2,5-dihydroxybenzoic acid dissolved in 50% (V/V) acetonitrile. The measurements were carried out on UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) in the linear positive ion mode. The mass spectra acquired by 6000 laser shots were accumulated and processed by FlexAnalysis software (Bruker Daltonics).

2.4. Statistical Analyses

Differences in ApoC-III sialylation status were evaluated using Wilcoxon test (comparison between GSD types 0, Ia and non-Ia vs. GSD types III and IX). Spearman correlation coefficient was used to assess correlation between the ApoC-III sialylation (expressed as “delta”; see Section 3) and triacylglycerol (TAG) levels within the whole analyzed group.

3. Results

Transferrin N-glycosylation was found to be normal in a majority of the analyzed samples; TF hyposialylation detected in some samples from patients less than (or equal to) 2 years old (P19-1, P20-1) gradually normalized with age (see Table 1). The relative distribution of individual ApoC-III sialylated isoforms separated by isoeletric focusing (IEF) was determined by densitometric quantification of the immunoblot (data in Table 1). To simplify the expression of the sialylation status of ApoC-III, we utilized Principal Component Analysis and introduced a new parameter ‘delta’ calculated as follows: $0.61 * (\text{ApoC-III}_1[\%]) + 0.17 * (\text{ApoC-III}_0[\%]) - 0.78 * (\text{ApoC-III}_2[\%])$. Delta explains 78% of the variability in our data. A comparison of ApoC-III sialylation expressed by delta between various GSD types vs. controls is shown in Fig. 1a (bar graph).

While the sialylation of ApoC-III in GSD types 0, Ia and non-Ia was rather variable and overall borderline, in the patients with GSD types III a IX (all but one) it was found to be consistently markedly reduced; the changes in GSD types III and IX, compared to the other GSD types, were statistically significant ($p = 0.0004$). The detected ApoC-III hypoglycosylation in individual samples was confirmed by subsequent analyses using SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry (complete data available upon request). These analyses also revealed a notable elevation of the aglycosylated form of ApoC-III with the glycosylation site absolutely unoccupied, predominantly in patients with GSD types III and IX. A representative profile from both IEF and MS analysis in a selected sample from one GSD III patient is given in Fig. 1c and d. Within the whole analyzed group, no correlation between delta values and the levels of plasma triacylglycerols was found ($p = 0.1940$).

Additionally, to find out whether IEF of ApoC-III can alternatively be performed in plasma, new samples of both serum and plasma were parallelly collected from 13 of the patients (GSD types Ia, non-Ia, III and IX) and analyzed. Furthermore, we determined cholinesterase (ChE) activity to examine the possible association between liver function (its synthetic capacity) and ApoC-III sialylation; the results of these additional analyses are available in Appendix Table A.2. In short, the paired serum and plasma samples had very similar ApoC-III profiles within the whole group, with minor differences attributable to the technical variability of Western blot; nevertheless, evaluations of the two patterns were always in agreement. While the 7 patients with GSD types III and IX invariably showed markedly pathological ApoC-III profiles, the observed ApoC-III hypoglycosylation in two out of six tested individuals with GSD types I (Ia and non-Ia) was connected with increased ChE activity (the sample size is, however, too small to make statistically substantiated conclusions).

4. Discussion

Our study in 24 individuals with various glycogen storage disorders revealed mild to profound serum ApoC-III hypoglycosylation in GSD types Ia, non-Ia, III and IX. Because one of the hallmark laboratory abnormalities in GSD is hypertriglyceridemia, and previous studies had confirmed the association between ApoC-III hyposialylation and increased plasma triacylglycerol (TAG) levels [32], we decided to include non-GSD hypertriglyceridemic subjects in our experiments. The statistical analysis within the whole analyzed group (see plasma TAG in Table 1), however, found no correlation between ApoC-III sialylation status and TAG. Likewise, we found no support for the possible role of liver dysfunction in the etiology of the detected ApoC-III hypoglycosylation in GSD, as assessed by correlating it with hepatomegaly and hepatopathy measurements (see Table 1). Moreover, the finding of significantly increased ratio of ApoC-III_2 to ApoC-III_1 in individuals with chronic liver disease reported by Harvey et al. [16] would suggest a rather opposite effect (i.e., ApoC-III hypersialylation). On the other hand, cholinesterase activity assay that we performed additionally in newly collected samples from 13 of the patients suggests that this parameter might be linked to ApoC-III hypoglycosylation in patients with GSD type Ia and non-Ia, but not in GSD types III and IX (see Appendix Table A.2). In this subsequent analysis we also demonstrated that IEF of ApoC-III can be performed in plasma with identical results as in serum (the standard material for this method).

Based on our observation of significantly more aberrant ApoC-III sialylation in GSD types III and IX compared to the rest, it is inviting to assume that the reason behind impaired ApoC-III glycosylation in these two disorders could be the reduced availability of the glycosylation substrates. GSD types III and IX share a defect in the same metabolic conversion (glycogen to Glc-1-P), which could lead to a decreased flux of precursors in the direction of forming UDP-GlcNAc, a substrate needed for the synthesis of CMP-NeuAc, as well as for producing UDP-GalNAc. However, it is difficult to validate this hypothesis by additional tests in the patients since ApoC-III is predominantly produced in liver and measuring the nucleotide sugar pools would require invasive biopsy. It is important to note that a glycosylation defect, involving both the N- and O-glycome, was already described in neutrophils from patients with GSD type non-Ia and with the *G6PC3* defect (OMIM: 612541) [33]. Mass spectrometry analysis of the neutrophils in the analyzed patient with G6PC3 deficiency showed reduced incorporation of galactose, especially into complex N-glycans and to a lesser extent into core 2 O-glycans, and the authors hypothesize that this could be a result of an insufficient UDP-Gal concentration in the Golgi. In another study by Raval et al., induced pluripotent cells (iPSC) were generated by reprogramming fibroblasts from patients with infantile-onset acid alpha-glucosidase deficiency (GSD type II) and were differentiated into cardiomyocytes (CM), in order to study the molecular basis of hypertrophic cardiomyopathy in Pompe disease [34]. Unexpectedly, the researchers discovered that the lysosomal-associated membrane proteins LAMP1 and LAMP2 had higher electrophoretic mobilities compared to a control and, consequently, established abnormal glycan processing in the Pompe iPSC-CM model. The observed hypoglycosylation of N-linked glycans was global and manifested a deficiency of higher complexity bisecting bi-antennary and multi-antennary glycans. They speculate that these changes are secondary to the disturbed glycogen metabolism, which, by disproportional consumption of UTP and Glc-6-P (to produce glycogen), limits the availability of these substrates for glycosylation reactions.

Another possible mechanism underlying the detected hypoglycosylation in our study might be the altered expression of *GALNT2*, which codes for polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 2 that specifically catalyzes the first step of ApoC-III O-glycosylation [35]. This could be caused by some (so far unidentified) metabolic factor, analogously to what was found in a study by Marucci et al. [36], who concluded that the decreased expression of *GALNT2* detected in patients with type 2 diabetes was secondary to hyperglycemia. In the case of our patients with GSD Ia and non-Ia, it seems plausible that the hypoglycosylated ApoC-III could be a consequence of altered *GALNT2* expression during the time of metabolic decompensation. This is partly supported by our analysis of the patients with multiple samples tested (P3, P10, P11). The ApoC-III glycosylation profile became more pathological after P3 experienced frequent hypoglycemia in the period of short-term non-compliance (sample P3-2) and when P10 showed severe metabolic decompensation at the time of diagnosis (sample P10-1), compared to when they were better compensated on a strict diet regime. There was no deterioration in terms of glycemic control, triglyceridemia, hepatopathy and hepatomegaly between the two measurements in P11 (6 months period, see Table 1) that could be associated with the worsening of his ApoC-III glycosylation. It is, however, worth mentioning that P11 presents with multiple complications (Crohn-like disease, recurrent infections, nephrotic syndrome, autoimmune thyroiditis, osteopenia, growth retardation and pubertal delay) with continuing long-term clinical disease progression. Unfortunately, cholinesterase (ChE) activity cannot be retrospectively assessed in these samples as the assay had not been performed, but it certainly would have been interesting to validate it as a predictor of ApoC-III sialylation. Noteworthily, the measurement of serum ChE was shown to be of diagnostic value for hepatic steatosis [37]. If the association between ApoC-III hypoglycosylation and increased ChE in GSD types I found in our additional analysis was confirmed in a larger sample size of patients with GSD types Ia and non-Ia, we could speculate that ApoC-III is hyposialylated in patients with more pronounced fatty liver (as reflected by increased ChE), which is a common complication in GSD types I. Thus, aberrant ApoC-III sialylation in GSD types I might signal progression of their hepatic steatosis. Interestingly, Sobenin et al. found that LDL-containing circulating immune complexes (LDL-CIC) detected in the blood of patients with coronary atherosclerosis have considerably lower sialic acid content than native LDL, and that the titer of LDL-CIC in serum significantly correlates with progression of atherosclerosis in human in vivo [38]. As increased total ApoC-III level is a well-documented

Table 1
ApoC-III and TF glycosylation in the context of selected clinical and laboratory data measured in the analyzed patients with glycogen storage disorders.

Diagnosis	Patient identification	Diagnosis confirmation method	Sex	Sample label	Age[1]	BMI [kg/m²][2]	Glycemic control[3]	Hepatomegaly[4] [cm below the costal margin]	Hepatopathy	ApoC-III sialylated isoforms[5] [% of total ApoC-III]				TF glycosylation -evaluation[7]	Plasma triacylglycerols [mmol/l]	Glycemia[9] [mmol/l]
										Disialo-	Monosialo-	Asialo-	Evaluation[6]			
Healthy controls	*Reference range*		*F + M*							*27.1–79.5*	*19.4–65.5*	*0–8.3*			*1.0–1.64*[8]	*3.3–5.8*
GSD 0	P1	MG	F	P1-1	1.5 y	16.8 (50. P)	poor	NP	NP	38.8	57.9	3.3	N	N	1.33	5.3
				P1-2	2.5 y	18.8 (99. P)	good		NP	48.6	47.7	3.7	N	N	0.44	5
GSD 0	P2	MG	M	P2-2	11.5 y	14.8 (11. P)	good	NP	NP	28.4	69.9	1.7	B	N	0.84	5.9
GSD Ia	P3	MG	M	P3-1	13.5 y	27.3 (>99. P; +3 SD)	good	+3	NP	30.8	66.1	3.2	B	B	3.22	4.7
				P3-2	14 y	26.7 (>99. P; +2.7 SD)	good		NP	28.8	71.2	ND	B	N	4.11	1.9§
GSD Ia	P4	MG	M	P4-1	29 y	26	poor	+10	NP	31.4	55.9	12.6	B	N	7.8	4.7
GSD Ia	P5	MG	M	P5-1	23 y	23.6	good	+4	NP	26.6	57	16.4	P	N	6.52	5.1
GSD Ia	P6	MG	F	P6-1	8.5 y	17.0 (65. P)	good	+4	NP	27.1	65.5	7.4	P	B	3.13	5.1
GSD Ia	P7	MG	M	P7-1	22 y	21.4	poor	+5	NP	28.1	64.6	7.3	N	N	9.98	5.3
GSD Ia	P8	MG	M	P8-1	24 y	23.1	poor	+4	2× ↑LFT's	27.1	63.1	9.8	P	N	12.37	5.8
GSD Ia	P9*	MG	M	P9-1	4 y	17.7 (90.6. P)	poor	+10	>5× ↑LFT's	29.1‡	54.5	16.4	P	N	19.28	3.5
GSD non-Ia (Ib)	P10	MG	M	P10-1†	4 m	17.1 (65. P)	poor	+3	1.5× ↑LFT's	31.9‡	66.9	1.2	P	NⅡ	7.52	5.6
				P10-2	9.5 y	19.8 (90. P)	good		NP	32.1	62.9	5	N	N	1.12	4.8
GSD non-Ia (Ib)	P11	MG	M	P11-1	19 y	26	good	+4	NP	39	50.1	10.9	B	N	4.77	4.5
				P11-2	19.5 y	24.6	good		NP	21.6	68.5	9.8	P	N	2.38	4.5
GSD non-Ia (Ib)	P12	MG	F	P12-1	2 m	14.3 (4.7. P)	poor	+6	NP	36.2	63.1	0.7	N	N	5.11	1
GSD IIIa	P13	E, MG	F	P13-1	1.5 y	16.1 (40. P)	good	+2	3.8 ×↑LFT's	33.7‡	57.2	9.1	P	N	9.3	6.5
				P13-2	7.5 y	15.9 (50. P)	good		3 ×↑LFT's	13.7	73.4	12.9	P	N	2.44	4.2
				P13-3	8 y	15.9 (45. P)	good		10.5 ×↑LFT's	21.4	57.7	21	P	N	4.99	3.9
GSD IIIa	P14	MG	F	P14-1	17 y	25. 3 (94.8. P)	poor	+9	9.5 ×↑LFT's	16.1	73.5	10.4	P	N	2.15	5.3
				P14-2	17.5 y	26. 0 (97.P)	poor		13 ×↑LFT's	22.3	71.1	6.6	P	N	2.2	4.1
GSD IIIa	P15	MG	M	P15-1	1.5 y	19.5 (91.7. P)	good	+10	20 ×↑LFT's	20.7	69.4	9.9	P	N	5.18	4
				P15-2	3 y	17.7 (86. P)	good		63 ×↑LFT's	26.8	61.7	11.5	P	N	4.2	4.8
				P15-3	7 y	16.9 (70. P)	good		6 ×↑LFT's	14.6	63.4	22	P	N	4.4	5.3
GSD IIIa	P16	E, MG	M	P16-1	6 y	19 (97.6. P)	good	+11	>22 ×↑LFT's	20.7	70.7	8.6	P	N	2.27	4.5
GSD IIIa	P17	MG	M	P17-1	16.5 y	NA	good	+5	4 ×↑LFT's	11.2	68.5	20.4	P	B	2.44	5.5
				P17-2	17 y	21. (45. P)	good		3.5 ×↑LFT's	14.1	63.5	22.5	P	B	1.97	4.2
GSD IIIa	P18	E, MG	F	P18-1	39.5 y	24.7	good	+2	2 ×↑LFT's	26.1	69	5	P	N	1.41	4.6
GSD IIIb	P19	HS	M	P19-1	2 y	18.7 (91.5. P)	good	+5	7.5 ×↑LFT's	31.2‡	64.9‡	3.9	P	PⅡ (3.8 %)	1.21	3.7
				P19-2	9.5 y	19.1 (83. P)	good		NP	14.5	80.5	5	P	N	0.65	3.7
				P19-3	10 y	19.1 (80. P)	good		NP	17.3	75.4	7.4	P	N	NA	NA
				P19-4	10.5 y	20.5 (90. P)	good		NA	16.8	78.6	4.6	P	N	NA	NA
GSD IXa	P20	HS	M	P20-1	2 y	16.9 (55. P)	good	+10	16 ×↑LFT's	36.5	58.1	5.4	N	P, type II	4.46	3.4
				P20-2	3 y	15.9 (45. P)	good		5 ×↑LFT's	15	75.6	9.4	P	N	3.77	4.1
GSD IXa	P21	E	M	P21-1	5 y	14.5 (24. P)	good	NP	NP	37.5	59.2	3.3	N	NⅡ	0.75	5.7
				P21-2	5.5 y	14.8 (35. P)	good		NP	30.8‡	64.1	5.1	B	N	1.2	4.4
GSD IXa	P22	HS	M	P22-1	15.5 y	19.5 (35. P)	good	+6	5 ×↑LFT's	13.4	72	14.7	P	B	1.33	5.1
GSD IXa	P23	E	M	P23-1	2.5 y	17.3 (79. P)	good	+2	1.5 ×↑LFT's	16.2	78.1	5.7	P	B	2.14	6.6
GSD IXa	P24	E	F	P24-1	26.5 y	22.9	good	NP	NP	16.3	74.8	9	P	N	1.33	4.2
Non-GSD hypertriglyceridemia:																
LPL deficiency	HTC1	E, MG	F	HTC1-1	8 y	14.7 (25. P)	good	NP	NP	40.4	51.2	8.5	B	N	14.1	5
LPL deficiency	HTC2	E, MG	M	HTC2-1	5 y	11.9 (0.6. P)	good	NP	NP	48.1	48.5	3.4	N	N	6.66	4
Unknown	HTC3		M	HTC3-1	3 y	14.6 (17. P)	good	NP	NP	46.6	50.3	3.1	N	NA	1.7	4.4

ApoC-III - apolipoprotein C-III, BMI - body mass index, E – enzymology, GSD - glycogen storage disease, F – female, HS – highly suspected, M – male, MG – molecular genetics, m – months, LFT's – liver function tests (expressed as multiples of alanine aminotransferase upper reference limit; controls <0.6), LPL – lipoprotein lipase, NA – not available, ND - not detected, NP – not present, P – percentile, SD – standard deviation, TF - transferrin, y – years.
red colour is used to outline the values outside the reference range for ApoC-III sialylation.
[1]At the time of sample collection.
[2]The percentiles are listed only for children (<18 years of age), because the interpretation of BMI values varies between children and adults, and the percentiles for BMI values in children are used to define overweight and obese categories.
[3]Patients were defined as having poor glycemic control when ≥2 hypoglycemias per 1 week were registered during in-house monitoring.
[4]Only the first measurement is listed (no change over time).
[5]Serum analyzed by isoelectric focusing with Western blot and quantified using densitometry analysis of the bands; coefficients of variation for intra-(CV1) and inter-(CV2) run variability: CV1:8.4, 6.8, 22.1 and CV2: 6.7, 4.9, 23.5 (for ApoC-III_2, ApoC-III_1 and ApoC-III_0, respectively; determined in a healthy control sample).
[6]Evaluated as normal (N), borderline (B) and pathological (P); for detailed description of the evaluation criteria, see Section 2.2.
[7]After analysis of serum by isoelectric focusing with immunofixation and quantification using densitometry analysis of the bands; evaluated as normal (N), borderline (B) or pathological (P); if pathological, profile type (I or II) is specified; serum alternatively analyzed by CDT (carbohydrate-deficient transferrin) test, a spectrophotometric analysis previously used to measure the percentage of hyposialylated transferrin; for quantification of individual sialylated isoforms and detailed description of the evaluation criteria, see Appendix Table A.1.
[8]For children aged 1–15 years; for children <1 year the reference range is 0.5–2.22, for >15 years 0.68–1.7.
[9]Average values from measurements performed 3–0 days prior to ApoC-III isoelectric focusing (biological half-life of ApoC-III is approximately 2.5 days).
*Patient treated for growth deficiency.
†Blood obtained at the time of diagnosis.
‡Outside the reference range determined for the corresponding age + sex category.
§The lowest value measured during hypoglycemia attacks 2–3 days prior to ApoC-III isoelectric focusing.
‖Analyzed by CDT (carbohydrate-deficient transferrin) test, a spectrophotometric analysis previously used to measure the percentage of hyposialylated transferrin; reference range: 1.5–2.9%.

risk factor for cardiovascular disease [39], and, recently, it has also been shown to be higher in diabetic patients with diabetic peripheral neuropathy [40], we believe it would be worthwhile to investigate its glycosylation status in these diseases and correlate it with the severity of the complications.

Lastly, we cannot exclude the possible involvement of endogenous sialic acid cleaving/transferring enzymes (neuraminidases [41], transsialidases [42]) in the patients' circulation, or an altered catabolism of ApoC-III glycoforms related to GSD pathophysiology. Further studies need to be performed to identify the underlying mechanism for the observed ApoC-III hypoglycosylation and to determine its implications for the disease course in patients.

5. Conclusions

In conclusion, our novel finding of significantly hypoglycosylated ApoC-III in patients with GSD types III and IX highlights it as a potent diagnostic marker for these disorders and potentially points to unrecognized aspects of their pathophysiology. In the context of a broad differential diagnosis after finding pathological ApoC-III glycosylation, specific CDG subtypes such as COG-CDG syndromes should be considered in GSD-suspected patients with hepatopathy and hepatomegaly. However, the presence of a severely affected liver function and the almost universal feature of a combined central nervous system impairment in patients with COG-CDG [43] help simplify the decision-making process. Specifically, ApoC-III analysis could be helpful for clinicians in the cases of suspected patients, whose clinical picture strongly suggests a particular type of GSD, but the corresponding enzymatic assays are within normal range. Since it is presumed by experts in the field that GSD type IX is greatly underdiagnosed, we suggest that this is where the simple ApoC-III test in serum or plasma could be of particular use. Moreover, our results in GSD types Ia and non-Ia suggest that the status of ApoC-III sialylation perhaps reflects metabolic (de)compensation in the patients.

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.004.

Author Contributions

N.O. performed the electrophoretic techniques and prepared the manuscript, T. H. participated in patients recruitment, collected samples and revised the manuscript, H. K. collected laboratory and clinical data, Z. P. performed the mass spectrometry analysis, J. M. supervised the mass spectrometry analysis, J. Z. participated in patients recruitment and manuscript revision, H. H. supervised the experimental part and revised the manuscript. All authors have approved the final manuscript.

Declarations of Interest

None.

Acknowledgements

The authors thank Václav Čapek, Ph.D. for executing the statistical analyses.

Funding

This work was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grants IGA MZ CR NT-12166-5/2011 and MZ CR AZV16-31932A; Grant Agency of the Czech Republic, GACR 14-36804G, Centre of mitochondrial biology and pathology (MITOCENTRE); and the grants RVO-VFN 64165/2012, UNCE 204011, and PROGRES Q26/206026-4. All rights reserved. The funding sources had no involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, or in the decision to submit the article for publication.

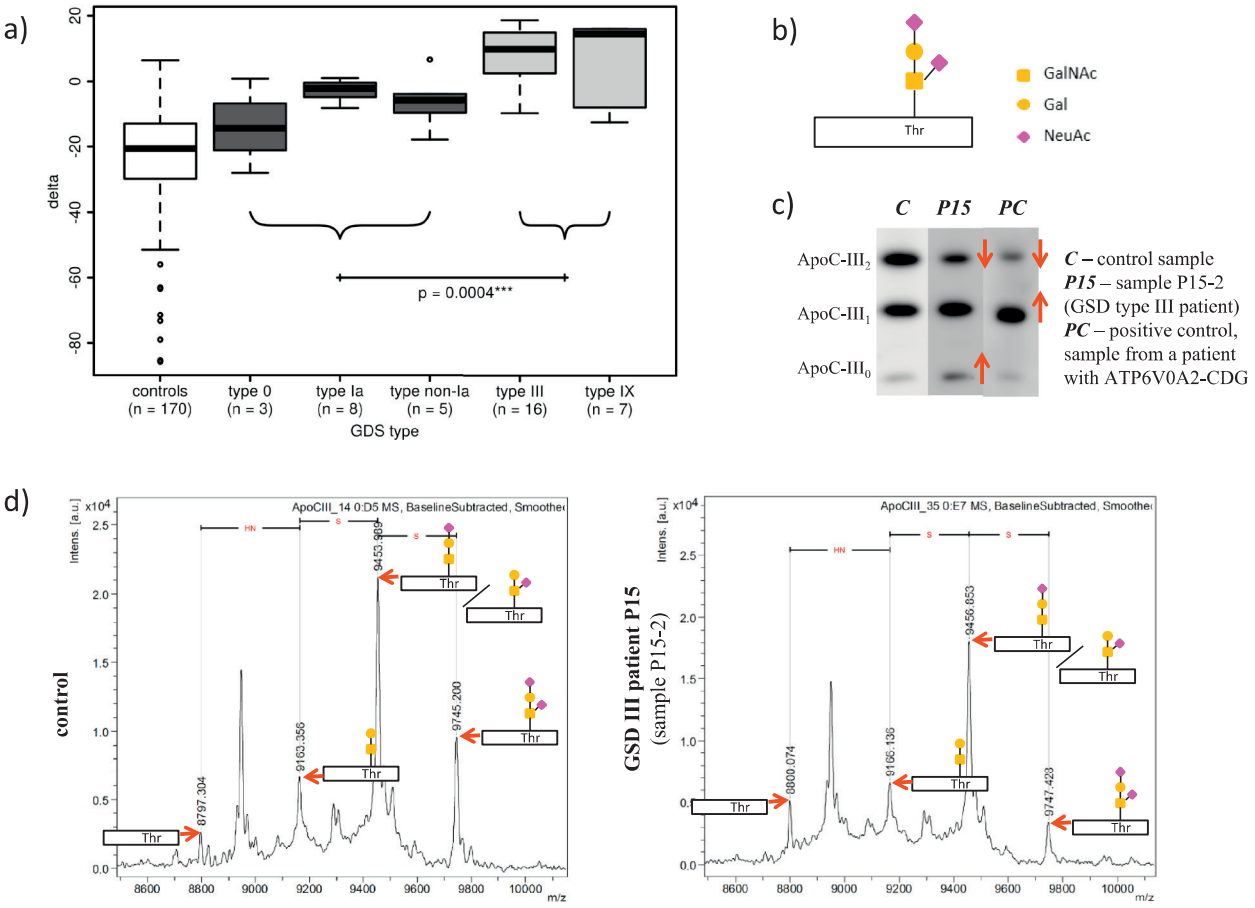


Fig. 1. Significant apolipoprotein C-III hypoglycosylation in GSD types III and IX. Comparison of ApoC-III sialylation status (delta parameter, calculated as follows: 0.61 ∗ (ApoC-III$_1$[%]) + 0.17 ∗ (ApoC-III$_0$[%]) — 0.78 ∗ (ApoC-III$_2$[%])) between controls and various GSD types (a). Illustration of the ApoC-III glycan structure (b). One selected sample from GSD type III patient (P15) analyzed by isoelectric focusing using PhastSystem Electrophoresis System (GE Healthcare) (c) and mass spectrometry on UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) (d). ****differences in delta values between the denoted groups (GSD types III and IX versus GSD types 0, Ia and non-Ia) were calculated to be statistically significant. Gal - galactose; GalNAc - N-acetylgalactosamine; NeuAc - N-acetylneuraminic acid (sialic acid).*

References

[1] Wopereis S, Grünewald S, Huijben KM, Morava E, Mollicone R, van Engelen BG, et al. Transferrin and apolipoprotein C-III isofocusing are complementary in the diagnosis of N- and O-glycan biosynthesis defects. Clin Chem 2007;53:180–7.

[2] Péanne R, de Lonlay P, Foulquier F, Kornak U, Lefeber DJ, Morava E, et al. Congenital disorders of glycosylation (CDG): quo vadis? Eur J Med Genet 2017. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10.012.

[3] Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A, et al. Group AD-tS: impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H +-ATPase subunit ATP6V0A2. Nat Genet 2008;40:32–4.

[4] Spaapen LJ, Bakker JA, van der Meer SB, Sijstermans HJ, Steet RA, Wevers RA, et al. Clinical and biochemical presentation of siblings with COG-7 deficiency, a lethal multiple O- and N-glycosylation disorder. J Inherit Metab Dis 2005;28:707–14.

[5] Foulquier F, Vasile E, Schollen E, Callewaert N, Raemaekers T, Quelhas D, et al. Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:3764–9.

[6] Foulquier F, Ungar D, Reynders E, Zeevaert R, Mills P, García-Silva MT, et al. A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. Hum Mol Genet 2007;16:717–30.

[7] Paesold-Burda P, Maag C, Troxler H, Foulquier F, Kleinert P, Schnabel S, et al. Deficiency in COG5 causes a moderate form of congenital disorders of glycosylation. Hum Mol Genet 2009;18:4350–6.

[8] Lübbehusen J, Thiel C, Rind N, Ungar D, Prinsen BH, de Koning TJ, et al. Fatal outcome due to deficiency of subunit 6 of the conserved oligomeric Golgi complex leading to a new type of congenital disorders of glycosylation. Hum Mol Genet 2010;19:3623–33.

[9] Kodera H, Ando N, Yuasa I, Wada Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, et al. Mutations in COG2 encoding a subunit of the conserved oligomeric golgi complex cause a congenital disorder of glycosylation. Clin Genet 2015;87:455–60.

[10] Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR, Boemi M, Olivieri F, Ceriello A, et al. N-glycomic changes in serum proteins in type 2 diabetes mellitus correlate with complications and with metabolic syndrome parameters. PLoS One 2015;10:e0119983.

[11] Savinova OV, Fillaus K, Jing L, Harris WS, Shearer GC. Reduced apolipoprotein glycosylation in patients with the metabolic syndrome. PLoS One 2014;9:e104833.

[12] Bilen O, Altun Z, Arslan N, Onvural B, Akan P, Coker C. The effect of malnutrition on protein glycosylation in children. Iran J Pediatr 2014;24:273–9.

[13] Chrostek L, Cylwik B, Gindzienska-Sieskiewicz E, Gruszewska E, Szmitkowski M, Sierakowski S. Sialic acid level reflects the disturbances of glycosylation and acute-phase reaction in rheumatic diseases. Rheumatol Int 2014;34:393–9.

[14] Allen AC. Abnormal glycosylation of IgA: is it related to the pathogenesis of IgA nephropathy? Nephrol Dial Transplant 1995;10:1121–4.

[15] Munce T, Heussler HS, Bowling FG. Analysis of N- and O-linked protein glycosylation in children with Prader-Willi syndrome. J Intellect Disabil Res 2010;54:929–37.

[16] Harvey SB, Zhang Y, Wilson-Grady J, Monkkonen T, Nelsestuen GL, Kasthuri RS, et al. O-glycoside biomarker of apolipoprotein C3: responsiveness to obesity, bariatric surgery, and therapy with metformin, to chronic or severe liver disease and to mortality in severe sepsis and graft vs host disease. J Proteome Res 2009;8:603–12.

[17] Stojkovic T, Vissing J, Petit F, Piraud M, Orngreen MC, Andersen G, et al. Muscle glycogenosis due to phosphoglucomutase 1 deficiency. N Engl J Med 2009;361:425–7.

[18] Timal S, Hoischen A, Lehle L, Adamowicz M, Huijben K, Sykut-Cegielska J, et al. Gene identification in the congenital disorders of glycosylation type I by whole-exome sequencing. Hum Mol Genet 2012;21:4151–61.

[19] Kilimann MW, Oldfors A. Glycogen pathways in disease: new developments in a classical field of medical genetics. J Inherit Metab Dis 2015;38:483–7.

[20] Saudubray J-M, Baumgartner MR, Walter JH. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. Springer; 2016; 121–35.

[21] Beauchamp NJ, Dalton A, Ramaswami U, Niinikoski H, Mention K, Kenny P, et al. Glycogen storage disease type IX: high variability in clinical phenotype. Mol Genet Metab 2007;92:88–99.

[22] Roscher A, Patel J, Hewson S, Nagy L, Feigenbaum A, Kronick J, et al. The natural history of glycogen storage disease types VI and IX: long-term outcome from the largest metabolic center in Canada. Mol Genet Metab 2014;113:171–6.

[23] Davit-Spraul A, Piraud M, Dobbelaere D, Valayannopoulos V, Labrune P, Habes D, et al. Liver glycogen storage diseases due to phosphorylase system deficiencies: diagnosis thanks to non invasive blood enzymatic and molecular studies. Mol Genet Metab 2011;104:137–43.

[24] Tang NL, Hui J, Young E, Worthington V, To KF, Cheung KL, et al. A novel mutation (G233D) in the glycogen phosphorylase gene in a patient with hepatic glycogen storage disease and residual enzyme activity. Mol Genet Metab 2003;79:142–5.

[25] Burwinkel B, Bakker HD, Herschkovitz E, Moses SW, Shin YS, Kilimann MW. Mutations in the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL) underlying glycogenosis type VI. Am J Hum Genet 1998;62:785–91.
[26] Morava E. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. Mol Genet Metab 2014;112:275–9.
[27] Gadomski T, Wong S, Honzik T, Misfeld A, Koch D, Brocke K, et al. Oral galactose supplementation in PGM1-CDG: as sweet as it sounds? J Inherit Metab Dis 2015;38:S38–9.
[28] Tegtmeyer LC, Rust S, van Scherpenzeel M, Ng BG, Losfeld ME, Timal S, et al. Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. N Engl J Med 2014;370:533–42.
[29] Ondrušková N, Honzík T, Kytnarová J, Matoulek M, Zeman J, Hansíková H. Isoelectric focusing of serum apolipoprotein C-III as a sensitive screening method for the detection of O-glycosylation disturbances. Prague Med Rep 2015;116:73–86.
[30] Wopereis S, Morava E, Grünewald S, Adamowicz M, Huijben KM, Lefeber DJ, et al. Patients with unsolved congenital disorders of glycosylation type II can be subdivided in six distinct biochemical groups. Glycobiology 2005;15:1312–9.
[31] Wada Y, Kadoya M, Okamoto N. Mass spectrometry of apolipoprotein C-III, a simple analytical method for mucin-type O-glycosylation and its application to an autosomal recessive cutis laxa type-2 (ARCL2) patient. Glycobiology 2012;22:1140–4.
[32] Yassine HN, Trenchevska O, Ramrakhiani A, Parekh A, Koska J, Walker RW, et al. The association of human apolipoprotein C-III sialylation proteoforms with plasma triglycerides. PLoS One 2015;10:e0144138.
[33] Hayee B, Antonopoulos A, Murphy EJ, Rahman FZ, Sewell G, Smith BN, et al. G6PC3 mutations are associated with a major defect of glycosylation: a novel mechanism for neutrophil dysfunction. Glycobiology 2011;21:914–24.
[34] Raval KK, Tao R, White BE, De Lange WJ, Koonce CH, Yu J, et al. Pompe disease results in a Golgi-based glycosylation deficit in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. J Biol Chem 2015;290:3121–36.
[35] Schjoldager KT, Clausen H. Site-specific protein O-glycosylation modulates proprotein processing - deciphering specific functions of the large polypeptide GalNAc-transferase gene family. Biochim Biophys Acta 1820;2012:2079–94.
[36] Marucci A, di Mauro L, Menzaghi C, Prudente S, Mangiacotti D, Fini G, et al. GALNT2 expression is reduced in patients with type 2 diabetes: possible role of hyperglycemia. PLoS One 2013;8:e70159.
[37] Nomura F, Ohnishi K, Koen H, Hiyama Y, Nakayama T, Itoh Y, et al. Serum cholinesterase in patients with fatty liver. J Clin Gastroenterol 1986;8:599–602.
[38] Sobenin IA, Salonen JT, Zhelankin AV, Melnichenko AA, Kaikkonen J, Bobryshev YV, et al. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes: role in atherosclerosis and diagnostic value. Biomed Res Int 2014;2014:205697.
[39] Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, et al. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. Circulation 2000;102:1886–92.
[40] Pek SLT, Sum CF, Yeoh LY, Lee SBM, Tang WE, Lim SC, et al. Association of apolipoprotein-CIII (apoC-III), endothelium-dependent vasodilation and peripheral neuropathy in a multi-ethnic population with type 2 diabetes. Metabolism 2017;72:75–82.
[41] D'Avila F, Tringali C, Papini N, Anastasia L, Croci G, Massaccesi L, et al. Identification of lysosomal sialidase NEU1 and plasma membrane sialidase NEU3 in human erythrocytes. J Cell Biochem 2013;114:204–11.
[42] Tertov VV, Kaplun VV, Sobenin IA, Boytsova EY, Bovin NV, Orekhov AN. Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein. Atherosclerosis 2001;159:103–15.
[43] Rymen D, Winter J, Van Hasselt PM, Jaeken J, Kasapkara C, Gokçay G, et al. Key features and clinical variability of COG6-CDG. Mol Genet Metab 2015;116:163–70.

Supplement 14]

***Kolářová, H.**, Honzík, T., Zeman, J. Poruchy cykly močoviny; Fenylketonurie; Glykogenóza typ Ia (Von Gierkeho nemoc); Glykogenóza typ non-Ia; Glykogenóza typ III (Coriho nemoc, Forbesova nemoc); Leberova hereditární optická neuropatie (LHON snydrom); Deficit lysosomální kyselé lipázy; Deficit lipoproteinové lipázy; Hypofosfatázie; MELAS.*

In ***Dědičné poruchy metabolismu v kazuistikách*** *(2016), Mladá fronta a. s., Praha, ISBN 978-80-204-4187-4*

Tomáš Honzík, Jiří Zeman a kol.

Dědičné poruchy metabolismu v kazuistikách

MLADÁ FRONTA

Tomáš Honzík, Jiří Zeman a kol.
Dědičné poruchy metabolismu v kazuistikách

Vyloučeni odpovědnosti
Autoři i vydavatel věnovali maximální možnou pozornost tomu, aby informace uvedené v knize odpovídaly aktuálnímu stavu znalostí v době přípravy díla k vydání. I když tyto informace byly pečlivě kontrolovány, nelze s naprostou jistotou zaručit jejich úplnou bezchybnost. Z těchto důvodů se vylučují jakékoli nároky na úhradu ať již přímých či nepřímých škod.

Tato kniha ani žádná její část nesmí být kopírována, rozmnožována ani jinak šířena bez písemného souhlasu vydavatele.

Podpořeno MZ ČR – RVO VFN64165.

Děkujeme všem pacientům a rodičům. Fotografie pacientů jsou prezentovány s jejich souhlasem či souhlasem zákonných zástupců.

MLADÁ FRONTA

© Tomáš Honzík, Jiří Zeman a kol. 2016
Cover © Renata Brtnická, 2016
© Mladá fronta a. s., 2016

Vydalo nakladatelství Mladá fronta a. s., Mezi Vodami 1952/9,
143 00 Praha 4, www.mf.cz

ISBN 978-80-204-4187-4

Seznam autorů

Hlavní autoři:

doc. MUDr. Tomáš Honzík, Ph.D.
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze

prof. MUDr. Jiří Zeman, DrSc.
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze

Spoluautoři:

MUDr. Martin Magner, Ph.D.
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze

MUDr. et RNDr. Pavel Ješina, Ph.D.
Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN v Praze

MUDr. Hana Kolářová
Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN v Praze

Recenzent:

prof. MUDr. Viktor Kožich, CSc.
Ústav dědičných metabolických poruch 1. LF UK a VFN v Praze

Kromě DPM diagnostikovatelných novorozeneckým screeningnem je diagnostika většiny DPM založena na klinickém podezření a metabolických, enzymatických a molekulárních vyšetřeních ve specializovaných centrech. Podmínky pro odběr a transport biologického materiálu by se měly dopředu konzultovat s příslušnou laboratoří.

Tab. 1.4 Novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu v ČR*)

Dědičná porucha metabolismu		Výskyt v populaci
Poruchy metabolismu aminokyselin/ organické acidurie	fenylketonurie (PKU) a hyperfenylalaninemie (HPA)	1 : 5300
	homocystinurie z deficitu cystathionin-β-syntázy (CBS), pyridoxin non-responzivní forma	1 : 20 000 – 1 : 100 000**)
	remethylační forma homocystinurie z deficitu methyltetrahydrofolátreduktázy (MTHFR)	vzácný
	glutarová acidurie typu I (GA I)	1 : 165 000
	leucinóza (MSUD – nemoc javorového sirupu)	1 : 662 000
	isovalerová acidurie (IVA)	1 : 220 700
Poruchy β-oxidace mastných kyselin	deficit dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD)	1 : 20 700
	deficit dehydrogenázy dlouhých 3-hydroxyacyl-CoA (LCHAD)	1 : 66 000
	deficit dehydrogenázy velmi dlouhých acyl-CoA (VLCAD)	1 : 165 000
	deficit karnitinpalmitoyltransferázy I (CPT I)	velmi vzácný
	deficit karnitinpalmitoyltransferázy II (CPT II)	velmi vzácný
	deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (CACT)	velmi vzácný
Poruchy cyklu močoviny	citrulinemie (CIT)	1 : 100 000**)
	argininemie (ARG)	velmi vzácná
Jiné DPM	deficit biotinidázy (BTD)	1 : 20 000 – 1 : 50 000**)

Pozn.:

*) Rozšířený novorozenecký screening byl v ČR zahájen 1. 10. 2009 a 1. 6. 2016 (Věstník MZ ČR, částka 6/2016). V ČR se kromě 15 DPM vyšetřuje i kongenitální hypotyreóza (výskyt 1 : 2700), kongenitální adrenální hyperplazie (1 : 13 200) a cystická fibróza (1 : 7000). Metodika tandemové hmotnostní spektrometrie používaná pro screeningové vyšetření může zachytit též hyperprolinemii, glutarovou acidurii typu II, deficit mitochondriálního trifunkčního proteinu, deficit 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenázy, argininjantarovou acidurii, citrulinemii typu II, deficit pyruvátkarboxylázy, maternální citrulinemii, deficit methionin adenosyltransferázy I/III, deficit glycin N-methyltransferázy, deficit S-adenosylhomocystein hydrolázy, homocystinurii z deficitu cystathionin-β-syntázy (CBS) – pyridoxin-responzivní formu, remethylační homocystinurie komplementačních skupin cblC, cblD, cblE, cblF, cblG a cblJ a deficit vitaminu B_{12}.

**) Odhadovaná incidence z evropské populace.

Cílem předložené knihy je snaha upozornit prostřednictvím konkrétních příkladů a osudů 47 pacientů s různými DPM na problematiku dědičných poruch metabolismu a poukázat na potřebu široké diferenciálně diagnostické rozvahy nad každým pacientem, u kterého není jasná etiopatogeneze klinických obtíží.

Praha, září 2016

2

Poruchy metabolismu aminokyselin a organické acidurie

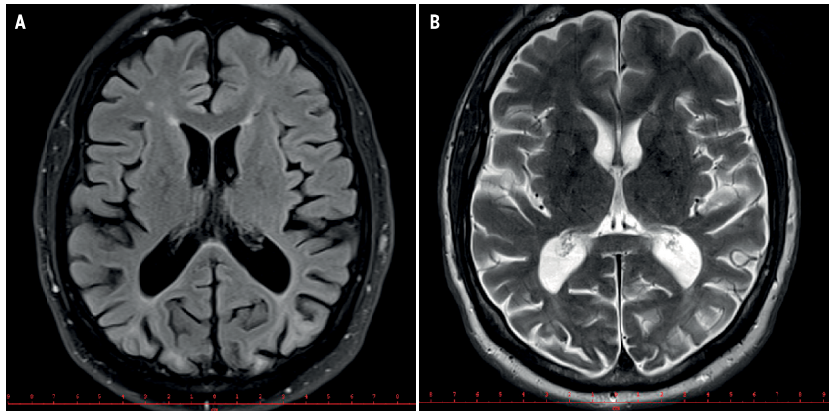
2.1 Fenylketonurie

Hana Kolářová, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika 1

Chlapec se narodil před zavedením novorozeneckého screeningu fenylketonurie (PKU) po protrahovaném porodu s porodní hmotností 3050 g (50. percentil) a délkou 50 cm (35. percentil). Jeho sestra je sledována na neurologii pro roztroušenou sklerózu, ostatní členové rodiny jsou zdrávi. Chlapcův psychomotorický vývoj byl od počátku opožděný; samostatně chodil až ve 2 letech. Významná byla i porucha mentálního vývoje a řeči. V 7 letech sice nastoupil do 1. třídy praktické školy, ale později byl pro těžký stupeň oligofrenie (IQ 35) a afektivní poruchy chování osvobozen od povinné školní docházky. Přesto se naučil samostatně oblékat, uvařit si čaj, namazat chleba a později i jezdit na kole. Jako mladý dospělý byl zbaven způsobilosti k právním úkonům a otec se stal jeho opatrovníkem.

Ve věku 42 let se objevily bolesti břicha, zad a poruchy chůze. CT vyšetření břicha provedené ve 47 letech objevilo retroperitoneální tumor, který byl později histologicky určen jako seminom, dobře reagující na chemoterapii. Vzhledem k dalšímu zhoršování chůze a jemné motoriky bylo indikované neurologické vyšetření, které potvrdilo spasticitu dolních končetin, lehkou rigiditu, posturální tremor na horních končetinách a těžký kognitivní deficit. Nález lehké senzitivní polyneuropatie při EMG vyšetření byl považován za poškození po chemoterapii. Magnetická rezonance (MRI) mozku odhalila parietální atrofii a difuzní subkortikální leukoencefalopatii *(viz obr. 2.1.1)*. S ohledem na anamnézu a nález při MRI vyšetření mozku bylo vysloveno podezření na onemocnění z okruhu dědičných poruch metabolismu.



Obr. 2.1.1 MRI mozku u 47letého muže s neléčenou fenylketonurií:
A) Na T1-vážených obrazech je patrná významná oboustranná dominantně parietální mozková atrofie.
B) Na T2-vážených obrazech pozorujeme difuzní změny v bílé hmotě mozkové.
(S laskavostí poskytla Klinika zobrazovacích metod LF UK a FN Plzeň.)

V klinickém nálezu při vyšetření v metabolické ambulanci dominovala kromě uvedené neurologické symptomatologie i světlá kůže a hypopigmentace vlasů a chloupků, ale nebyl přítomen ekzém ani typický zápach potu a moči po myšině. Vyšetření sérových aminokyselin ukázalo vysokou hladinu fenylalaninu (Phe) (1574 µmol/l, norma < 120) s patologickým poměrem mezi Phe a tyrosinem (Tyr) (23, norma < 2) a svědčilo pro PKU. Diagnózu klasické PKU podpořilo i vyšetření organických kyselin v moči s nálezem vysoké koncentrace kyseliny fenylpyrohroznové, fenylmléčné a fenyloctové. Aktivita dihydropteridinreduktázy (DHPR) v suché krevní kapce byla v normě a ani vyšetření pterinů v moči nesvědčilo pro poruchu metabolismu tetrahydrobiopterinu (BH4). Konečné slovo v diagnostice měla analýza DNA, která ukázala, že 47letý pacient je složený heterozygot pro dvě substituční bodové mutace c.[193A>G]; [1222C>T]; p.[Ile65Val]; [Arg408Trp] v genu *PAH* kódujícím fenylalaninhydroxylázu (PAH).

Další sledování hladin Phe u pacienta (1501 µmol/l, norma < 120) svědčí o tom, že rodina není schopna zajistit nízkobílkovinnou dietní terapii. Jeho hybnost se bohužel progresivně zhoršuje. V současnosti již není schopen samostatné chůze a vyžaduje celodenní péči sedmdesátiletého otce.

Kazuistika 2

Dívka z fyziologické gravidity zdravých rodičů se narodila v termínu s porodní hmotností 2780 g (10. percentil) a porodní délkou 51 cm (75. percentil). Nebyla křísená a dobře se přisála k prsu. Novorozenecký screening provedený 3. den života ukázal vysokou hladinu Phe 734 µmol/l (norma < 120) s patologickým poměrem mezi Phe a Tyr 19 (norma < 2). Bylo vysloveno podezření na PKU a dívka byla 8. den života přijata na metabolickou jednotku, kde kontrolní vyšetření ukázalo, že hladina Phe ještě stoupla: Phe v suché krevní kapce 1851 µmol/l (norma < 120) a v séru 2232 µmol/l (norma < 150) (hladina Phe v séru je o 20 % vyšší než v kapilární krvi; *viz tab. 2.1.1*). Pomocí perorálního testu s BH4 kofaktorem PAH, stanovením pterinů v moči a vyšetřením aktivity DHPR bylo možno vyloučit maligní formu PKU z důvodu poruchy metabolismu BH4. Diagnóza klasické formy PKU byla potvrzena i na molekulární úrovni. Dívka je homozygot pro prevalentní mutaci c.1222C>T; p.Arg408Trp v genu *PAH*.

Ve snaze snížit hladinu Phe bylo u dívky na 24 hodin vysazeno mateřské mléko (MM) a její výživa byla zajištěna pomocí potraviny pro zvláštní lékařské účely (PZLÚ). Toto mléko, určené pro novorozence a malé kojence s PKU, obsahuje směs esenciálních aminokyselin bez Phe a takové množství sacharidů, tuků, iontů, stopových prvků a vitaminů, aby se svým složením co nejvíce podobalo MM. Protože Phe zůstává esenciální aminokyselina pro proteosyntézu i u dětí s PKU, bylo u dívky nutné následné zavedení kombinované výživy PZLÚ s postupně stoupající dávkou MM (zpočátku 100 ml a později až 220 ml MM na den), díky které došlo k postupnému poklesu hladiny Phe na 153 µmol/l. Doporučení ohledně poměru mezi množstvím přirozené výživy (MM) a umělé výživy (PZLÚ) se měnilo v závislosti na hmotnostních přírůstcích a hladinách Phe, jež by měly být v prvních letech života < 240 µmol/l. Od 5. měsíce byly postupně zaváděny zeleninové a ovocné příkrmy a později i další potraviny s nízkým obsahem Phe (např. nízkobílkovinné pečivo).

Dívka dietu dobře tolerovala a hezky prospívala (v 6 měsících měla 6500 g a v 1 roce 10 kg). Očkování proběhlo dle běžného očkovacího schématu. Psychomotorický vývoj byl v normě: ve 3 měsících věku pásla koníčky, v 7. měsíci se posadila a v jednom roce začala chodit a mluvit. V průběhu batolecího, předškolního a školního věku byla metabolicky dobře kompenzována, s krátkými výjimkami v období horečnatých infekcí, při kterých hladiny Phe vystoupaly až na 750 µmol/l, což bylo občas doprovázeno i nepříjemným zápachem moči po myšině. Úprava dietního režimu vždy vedla k rychlé úpravě.

Dívka se až na mírné obtíže s matematikou dobře učila. Ukončila základní vzdělání a úspěšně složila i maturitní zkoušku na střední škole. V průběhu dospívání se naučila sama počítat dietu a připravit vlastní jídelníček podle obsahu Phe v jednotlivých potravinách (*viz tab. 2.1.2*). Doporučený příjem Phe činil cca 1000 mg/den, což odpovídá cca 25 g přirozených bílkovin, podstatná část bílkovin tedy byla stále hrazena umělou výživou pomocí PZLÚ. Dívka byla po dosažení pohlavní dospělosti navíc opakovaně poučena o nutnosti plánovaného těhotenství se zpřísněním diety. Denzitometrické vyšetření ve věku 22 let ukázalo osteopenii v oblasti bederní páteře (Z-skóre -1,9) a hraniční nález na proximálním femuru (Z-skóre -0,8). Bylo doporučeno zvýšit denní příjem vápníku a laboratorně byly monitorovány kalciurie a hladiny vitaminu D a parathormonu. Kontrolní denzitometrické vyšetření s odstupem několika let ukázalo významné zlepšení Z-skóre (bederní páteř -1,1 a proximální femur -0,4).

Když se dívka rozhodla pro plánovanou graviditu, byla zahájena prekoncepční příprava s cílem snížit hladinu Phe ze současných 700 µmol/l pod 240. Denní příjem Phe byl postupně snižován z původních 1000 mg na 350 mg/den; zvyšován byl naopak denní příjem speciální PZLÚ s vyšším obsahem minerálů a stopových prvků. Přísná nízkofenylalaninová dieta byla dodržována až do 20. gestačního týdne, po kterém bylo u těhotné ženy možno díky stoupající funkci jaterní PAH rostoucího plodu postupně zvyšovat příjem Phe až na 800 mg/den na konci těhotenství. Gravidita proběhla bez komplikací; hladiny Phe se pohybovaly v pásmu dobré dietní kompenzace (96–281 µmol/l). Porod proběhl císařským řezem pro předčasný odtok plodové vody ve 35. gestačním týdnu. Mamince se narodila dcera s porodní hmotností 1920 g a délkou 43 cm. Poporodní adaptace dítěte proběhla bez komplikací a postupně bylo možno zahájit výživu MM. Psychomotorický vývoj dítěte odpovídá věku.

Dietní doporučení se po porodu vrátila na původní příjem 1000 mg Phe/den a jídelníček se upravuje podle aktuálních hladin Phe ve spolupráci s nutriční terapeutkou.

Mladé ženě je nyní 24 let a pracuje jako administrativní pracovnice. Má světlou pleť i vlasy a subjektivně se cítí v pořádku. Kromě diety trvale užívá vápník, vitamin D a antikoncepci. Frekvence kontrol v metabolické ambulanci se snížila na tři ročně; hladiny Phe se pohybují v rozmezí 700–900 µmol/l. Jednou ročně jsou laboratorně monitorovány hladiny železa, feritinu, vitaminu B_{12}, stopových prvků a L-karnitinu.

Teoretická část

Etiologie

Klasická forma PKU (cPKU) je dědičná porucha metabolismu aminokyselin, která je způsobena závažnou poruchou jaterní PAH s aktivitou < 1 % normy. PAH katalyzuje přeměnu Phe na Tyr. Dědičnost PKU je autosomálně recesivní. Pacienti s klasickou PKU mají bez léčby hladiny Phe v krvi > 1200 µmol/l (norma 30–120). Mírnější enzymatické defekty s aktivitou PAH 1–2 % se projevují nižšími hladinami Phe v krvi (600–1200 µmol/l) a označují se jako mírná forma PKU (mPKU) nebo mírná hyperfenylalaninemie (HPA, non-PKU) s hladinami Phe v krvi 120–600 µmol/l. Klasická forma PKU spolu s mírnějšími formami PKU odpovídá za 98–99 % případů HPA v naší populaci a má u nás incidenci 1 : 5300. Při dnešní porodnosti to znamená, že se v Česku každým rokem narodí kolem 20 dětí s PKU. V ČR bylo dosud diagnostikováno > 700 dětí a dospělých s PKU.

Zvýšenou hladinu Phe mohou u 1–2 % případů způsobit i další dědičně podmíněná onemocnění, která se označují jako maligní PKU. Patří k nim především poruchy syntézy BH4, který slouží jako kofaktor jaterní PAH, a porucha recyklace DHPR.

Klasická PKU byla poprvé popsána norským lékařem a biochemikem Asbjørnem Følligem. Ten byl požádán o pomoc s objasněním případu dvojčat, která se narodila zcela zdravá, ale později se u nich objevily příznaky těžké mentální retardace. Typický zápach moči po myšině těchto dětí navedl Føllinga k jejímu intenzivnímu zkoumání, které vedlo k identifikaci α-ketokyseliny fenylpyruvátu neboli kyseliny fenylpyrohroznové. Později v pokusu s bakterií *Proteus vulgaris* prokázal svou teorii, že za klinickými projevy stojí porucha metabolismu Phe (bakterie *Proteus vulgaris* dokáže přeměnit aminokyselinu fenylalanin na kyselinu fenylpyrohroznovou a intenzita zeleného zabarvení při detekci této kyseliny odpovídala koncentraci fenylalaninu v séru). Práce, ve které Følling v roce 1934 popsal klasické příznaky PKU, vedla k diagnóze této choroby u mnoha dětí s mentální retardací po celém světě. Vysoká hladina Phe, který se u pacientů s PKU nemůže metabolizovat na Tyr, alternativně vede ke zvýšené přeměně Phe na kyseliny fenylpyrohroznovou, fenylmléčnou a fenyloctovou. Především zvýšená hladina kyseliny fenyloctové je příčinou zvýšené iritability pokožky a chronické dermatitidy (ekzému) typické pro neléčené pacienty s PKU.

Nedostatek Tyr, který je v centrálním nervovém systému ještě umocněn jeho soutěžením s vysokými hladinami Phe o transport přes hematoencefalickou bariéru, vede ke snížené syntéze monoaminových neurotrasmiterů a melaninu. Nedostatek melaninu způsobuje charakteristický obraz světlé kůže a vlasů doprovázených fotosenzitivitou. Mnohem závažnější pro neléčené pacienty s PKU je však chybění dopaminergních neurotransmiterů v centrálním nervovém systému s následným rozvojem parkinsonismu. Nedostatek neurotransmiterů v oku vede k poruše zrakové kontrastní citlivosti.

K poruchám funkce CNS však nedochází jen na podkladě nedostatku Tyr. Ukázalo se, že vysoké hladiny Phe inhibují funkci 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A (HMG-CoA) reduktázy v fenylalaninsenzitivních oligodendrocytech frontálních oblastí mozku, konkrétně v *corpus callosum*, optickém traktu, subkortikální a periventrikulární bílé hmotě. Inhibice HMG-CoA reduktázy, která představuje klíčový prvek v syntéze cholesterolu, způsobuje hypomyelinizaci CNS. Myelin je důležitý nejen pro převod vzruchů, ale i pro maturaci samotných neuronů (arborizaci axonů) a tvorbu neurotransmiterů. Zdá se, že velikost a počet lézí bílé hmoty přímo koreluje s hladinami Phe v krvi.

Maternální hyperfenylalaninemie: Vysoké hladiny Phe u těhotných žen vedou k fenylalaninové embryopatii a fetopatii (intrauterinní růstová retardace, vrozené srdeční vady a mikrocefalie s následným rozvojem mentální retardace s poruchami chování). Koncentrační schopnost placenty má za následek dvojnásobné hodnoty Phe v krvi plodu než v krvi těhotné ženy. Jedinou prevencí fenylalaninové embryopatie u těhotných žen s PKU je plánovaná gravidita, pečlivá prekoncepční příprava, přísná restrikce Phe v dietě a paralelní snížení sérových hladin Phe pod 240 µmol/l již před otěhotněním.

Klinické projevy

Klinické projevy u neléčených pacientů s klasickou PKU zahrnují progresivní, ireverzibilní poškození mnoha funkcí CNS, které začíná již v kojeneckém věku zpomalením psychomotorického vývoje a mikrocefalizací. Úroveň mentálních funkcí (DQ/IQ) klesá na < 50 bodů. Rozvíjí se spasticita, extrapyramidová symptomatologie (parkinsonismus, tremor) a poruchy chůze. Epilepsie se manifestuje u 25 % pacientů, ale u více než 80 % nemocných jsou přítomny charakteristické abnormality na EEG. Většina neléčených pacientů vykazuje behaviorální problémy s hyperaktivitou, mohou se objevit obsese a kompulze, stereotypie, agresivita či anxiozita. Charakteristickými známkami neléčených pacientů jsou zápach moči po myšině, ekzém, řídké světlé vlasy, snížená pigmentace duhovky a porucha růstu.

V dnešní době se díky novorozeneckému screeningu a dietní léčbě vyskytují závažné klinické případy PKU jen naprosto výjimečně. Přesto nás sporadické případy pozdně nebo nesprávně diagnostikovaných dětí s PKU nadále ujišťují o nutnosti zahrnout PKU do diferenciální diagnostiky u pacientů s mentální retardací nejasné etiologie *(viz výše – kazuistika 1)* a u dětí, které se narodily v zemích, kde novorozenecký screening nebyl dosud zaveden.

Diagnostika

PKU nese prvenství nejen v oblasti léčby, ale je také první nemocí vyhledávanou pomocí novorozeneckého screeningu. S prvním screeningovým testem na PKU přišel profesor Robert Guthrie z Buffalské univerzity, který využil na Phe závislý růst kultury bakterií *Bacillus subtillis*, jež se lépe a rychleji dělí v přítomnosti vyšší hladiny Phe difundující do kultivačního média z papírku nasátého kapilární krví dětí s PKU. Plošný screening PKU byl na území bývalého Československa zaveden v roce 1975 díky prof. Josefu Hyánkovi a doc. Bohunce Blehové. Mezi další screeningové testy, které se používaly pro diagnostiku PKU, patřila papírová chromatografie a fluorimetrie. Od roku 2009 se v ČR pro novorozenecký screening PKU používá výhradně metoda tandemové hmotnostní spektrometrie, která měří nejen hladinu Phe, ale i poměr mezi Phe a Tyr.

Krevní kapky pro novorozenecký screening se odebírají na speciální filtrační papírek ze zevní strany patičky u novorozence ve věku mezi 48. a 72. hodinou života. U všech novorozenců s pozitivním screeningem je třeba vyšetření co nejdříve zopakovat kvůli vyloučení eventuálního falešně pozitivního nálezu. V případě pozitivního kontrolního testování je nutno doplnit vyšetření pterinů v moči a změřit aktivitu DHPR v kapilární krvi k vyloučení maligní formy PKU. Na některých pracovištích se provádí i zátěžový test s BH4 ve formě sapropterin-dihydrochloridu.

Diagnózu následně potvrdí molekulárně genetické vyšetření genu *PAH* nebo genů pro enzymy, jež se podílejí na metabolismu BH4.

Léčba

Počáteční snahy o terapii PKU pouze pomocí přísné nízkobílkovinné diety bez suplementace esenciálními aminokyselinami byly až do poloviny 20. století neúspěšné, protože postižené děti neprospívaly a měly poruchu růstu. Chemik Louis I. Woolf z Great Ormond Street Hospital v Londýně vyslovil teorii, že děti s PKU by bylo možné léčit speciální výživou se sníženým obsahem Phe, čehož docílil enzymatickým štěpením kaseinu a odstraňováním Phe pomocí aktivního uhlí. Nový preparát, který byl později nazván Lofenalac, byl doplněn o malé množství mléka jakožto zdroje nezbytného Phe. Účinnost navrženého postupu prokázal prof. Horst Bickel v letech 1954–1955, který tak zahájil první úspěšnou léčbu dědičných poruch metabolismu.

Výroba dietetik, jež se dnes označují jako potraviny pro zvláštní lékařské účely (PZLÚ), se od té doby značně změnila. Na trhu je dostupné velké množství komerčně vyráběných směsí esenciálních aminokyselin bez Phe v práškových či tekutých formách, v granulích i tabletách, které jsou obohacené o ionty, stopové prvky, vitaminy a polynenasycené mastné kyseliny. Řada z nich obsahuje pro zlepšení chutě i různé ovocné příchutě. Pro novorozence a kojence s PKU byla připravena tekutá dietetika bez Phe, která se podobají umělé mléčné výživě.

V průběhu let se měnil i názor na délku nízkofenylalaninové diety. V 60. a 70. letech 20. století převládal názor, že dietu je možno ukončit ve věku 6–10 let, protože se předpokládalo, že vysoká hladina Phe poškozuje jen rostoucí mozek. Postupně však řada lokálních i multicentrických studií jednoznačně prokázala škodlivý dopad vysokých hladin Phe u pacientů s předčasně ukončenou dietoterapií nejen v průběhu dospívání, ale i v dospělosti. Proto všechny současné terapeutické postupy pro pacienty s PKU doporučují jen celoživotní nízkofenylalaninovou dietu. Výjimku tvoří cca 10–15 % PKU pacientů s BH4 plně responzivním genotypem, u kterých pravidelné perorální podávání sapropterinu (syntetického analoga BH4) natolik příznivě ovlivní špatně sbalený protein PAH, že se dostatečně sníží hladina Phe. Rozšíření této léčby však v některých zemích brání příliš vysoká cena, která je několikanásobně vyšší, než kolik činí finanční náklady na dietoterapii.

Cílem dnešní léčby novorozenců s PKU je snaha snížit hladinu Phe v krvi a trvale ji udržet v hodnotách, které nejsou pro organismus škodlivé. Doporučené hladiny Phe pro jednotlivá věková období jsou uvedena v *tab. 2.1.1*. K úpravě hladin Phe slouží PZLÚ s jeho sníženým obsahem. Phe však nelze z výživy zcela vynechat, protože je esenciální aminokyselinou i pro pacienty s PKU. Nízkofenylalaninová dieta je proto koncipována podle individuální tolerance pacienta tak, aby denní příjem Phe odpovídal pouze potřebám proteosyntézy, růstu, vývoji a funkci proteinů, ale již nebyl určen k jaterní přeměně Phe na tyrosin. Obsah Phe ve vybraných potravinách je uveden v *tab. 2.1.2*.

Při vybírání přirozených potravin pro pacienty s PKU je třeba upřednostnit potraviny s nízkým obsahem Phe, což podle našich zkušeností zatěžuje rodinné finance cca o 1200 Kč měsíčně více, než kolik činí rozpočet na jídlo v rodině bez PKU. To může vést v některých rodinách k nízké *compliance* diety u postiženého dítěte a rozvoji zdravotních komplikací.

Tab. 2.1.1 Doporučené hladiny fenylalaninu v kapilární krvi*) u dětí a dospělých s fenylketonurií v ČR)**

Věk (roky)	Doporučená hladina Phe (μmol/l)	Frekvence monitorování hladin
0–1	120–240	1× týdně
1–3	120–240	2× měsíčně
4–6	120–360	1× měsíčně
7–10	120–480	4× ročně
11–18	120–600	4–6× ročně***)
Muži	120–700	2× ročně
Ženy před graviditou	120–600	4× ročně
Gravidita	120–240	1× týdně
Ženy po graviditě	120–700	3× ročně

Pozn.:

*) Doporučené hladiny platí pro Phe měřený v kapilární krvi z prstu metodou tandemové hmotnostní spektrometrie. Hladina Phe měřená v séru/plazmě pomocí automatického analyzátoru aminokyselin je cca o 20 % vyšší.

**) V některých zemích jsou doporučení pro mladistvé a dospělé přísnější.

***) Frekvence laboratorních kontrol u mladistvých závisí na jejich *compliance*. V některých zemích je frekvence laboratorních kontrol u dospělých pacientů kromě těhotných nižší.

Tab. 2.1.2 Obsah fenylalaninu (mg) ve 100 g potravin nebo 100 ml tekutin

(zdroj: Potravinové tabulky výživových hodnot, Národní sdružení PKU a jiných DMP, 2012)

Výživa/výrobek/potravina	Fenylalanin (mg) ve 100 g
Maso hovězí – pečená plec	1716
Tvaroh tvrdý	1544
Arašídy pražené a solené	1227
Maso kuřecí – prsa bez kůže	905
Králík	823
Křupky arašídové	770
Lososs	758
Salám šunkový	756
Sója vařená	756
Vejce slepičí	728
Chléb pšeničný bílý	433
Corn flakes	430
Tatranky lískooříškové	426
Bageta	394
Čočka vařená	345
Hrách zelený vařený	339
Špekáčky	298
Kobliha	293

Chips Bohemia horská sůl	275
Čokoláda nugátová průměr	250
Jogurt bílý 3–5 % tuku	234
Zlaté čokopiškoty malinové	175
Mléko kravské plnotučné	153
Kukuřice zlatá sterilizovaná	129
Fíky sušené	120
Brokolice	119
Avokádo	111
Brambory zimní	101
Špenátový protlak zmražený	101
Těstoviny dvojvaječné vařené	100
Brambory rané	84
Fazolky zelené	73
Umělé počáteční mléko	55
Paprika červená	53
Banán	44
Mateřské mléko	40
Kiwi	38
Máslo	34
Broskve	23
Džus pomerančový	16
Okurka	14
Jablko	11
Přesnídávka jablečná	10,5
Pivo světlé 12°	10
Víno červené	2

Prognóza

Prognóza pacientů s PKU, kteří jsou na celoživotní terapii a mají hladiny Phe trvale v doporučených rozmezích, je velmi dobrá. To se týká i mladistvých s PKU, pokud období jejich často snížené *compliance* léčby v průběhu dospívání netrvá příliš dlouho a hladiny Phe nejsou dlouhodobě příliš vysoké.

Pacienty s předčasně ukončenou léčbou čeká řada zdravotních problémů. Ve srovnání s celoživotně léčenými nemocnými, u nichž se hladiny Phe pohybovaly v rozmezí 600–1080 µmol/l, dosahují pacienti s PKU, kteří ukončili dietu a dlouhodobě mají hladiny Phe 900–2400 µmol/l, nižšího stupně IQ (92) než osoby na dietě (104). Dospělí pacienti s PKU, kteří ukončili dietu, jsou mnohem častěji odkázáni na sociální podporu. Mají psychiatrické obtíže a poruchy kognitivních funkcí (paměťové schopnosti, pozornost, vyjadřování a porozumění).

Metanalýza 11 studií hodnotících úroveň exekutivních funkcí u mladistvých a dospělých pacientů s PKU s rozdílnou *compliance* ukázala u pacientů s vyššími hladinami Phe pomalejší reakční dobu (schopnost zpracovávat informace a reagovat na ně automaticky a plynule), zhoršenou inhibici (schopnost vyfiltrovat nežádoucí podněty; opakem je impulzivita), pozornost a motorickou kontrolu. Přestože mírně horší výsledky ve srovnání se zdravou skupinou měli i pacienti s dobrou dietní kontrolou (hladina Phe v krvi < 400 µmol/l), výsledky pacientů s hladinami ≥ 400 µmol/l byly významně horší, a to především v testech studujících schopnost koncentrace, plánování a vizuálního vyhodnocování včetně paměti.

Bilder et al. ve své práci zahrnuli 64 pacientů s PKU, z nichž 50 % vykazovalo symptomy psychiatrických onemocnění (obsese – kompulze, deprese, anxieta, fobie, paranoia, somatizace, vztahovačnost) kromě agresivity. Pacienti s PKU dlouhodobě léčení dietou, kterou později přerušili, měli na MRI mozku prokazatelné změny bílé hmoty. Tyto změny jsou ukazatelem redukce myelinu, k níž dochází v důsledku vyšších hladin Phe, a přímo korelují s dobou vysazení diety. Z 15 pacientů s PKU, kteří ukončili dietu na začátku druhé dekády života, mělo 13 (93 %) difuzní leukoencefalopatii na MRI mozku a klinicky hyperreflexii (80 %), spastickou paraparézu (60 %), tremor (53 %), psychiatrické obtíže (53 %), epilepsii (20 %), dystonii (13 %), ataxii (7 %) a parkinsonismus (7 %). U většiny z nich došlo po znovuzavedení diety ke zlepšení klinických příznaků.

Dlouhodobým problémem u pacientů s PKU na přísné dietě je i vysoké riziko rozvoje osteopenie a osteoporózy na podkladě nedostatečného dosažení kostního maxima. Mineralizace kostí je u pacientů s PKU pravděpodobně ovlivněna více faktory, mezi něž patří především protein-restrikční dieta, nízká dietní *compliance* s vysokými hladinami Phe a nedostatečný příjem vápníku, dalších minerálů, stopových prvků atd. V naší studii se 44 pacienty s PKU ve věku 6–29 let jsme prokázali osteopenii u 32 % z nich a osteoporózu u 14 %.

Literatura:

1. Bilder DA et al.: Psychiatric symptoms in adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 2013; 108: 155–160.
2. Burgard P et al.: Rationale for the German recommendations for phenylalanine level control in phenylketonuria 1997. *Eur J Pediatr* 1999; 158: 46–54.
3. Daelman L et al.: Progressive neuropsychiatric manifestations of phenylketonuria in adulthood. *Rev Neurol (Paris)* 2014; 170: 280–287.
4. Leuzzi V et al.: Clinical significance of brain phenylalanine concentration assessed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23: 563–570.
5. Moyle JJ et al.: Meta-analysis of neuropsychological symptoms of adolescents and adults with PKU. *Neuropsychol Rev* 2007; 17: 91–101.
6. Thompson AJ et al.: Brain MRI changes in phenylketonuria. Associations with dietary status. *Brain* 1993; 116: 811–821.
7. van Spronsen FJ et al.: Key European Guidelines for the Diagnosis and Management of Patients with Phenylketonuria. 2016, in press.
8. Zeman J et al.: Bone mineral density in patients with phenylketonuria. *Acta Paediatr* 1999; 88: 1348–1351.

2.2 Tyrosinemie typu I

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

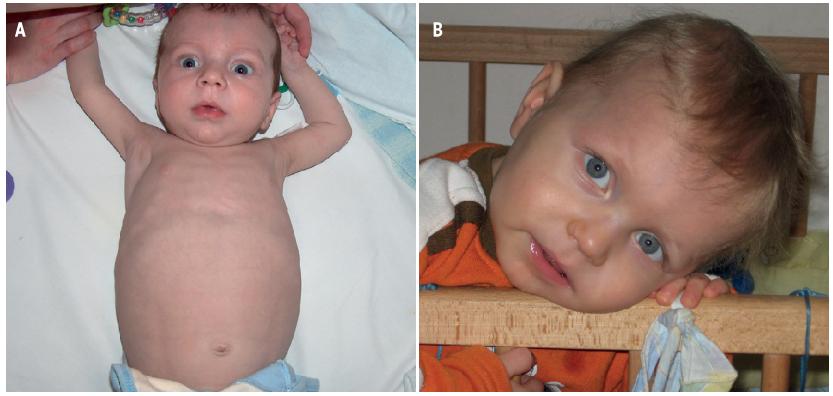
Kazuistika

První klinické příznaky se u chlapce s nevýznamnou rodinnou a perinatální anamnézou objevily ve věku 4 měsíců. Chlapec byl kojen dva měsíce, pak byl převeden na umělou kojeneckou mléčnou výživou, první nemléčný příkrm byl zaveden ve věku 5 měsíců. V tomto období si rodiče všimli velkého bříška, chlapec váhově neprospíval a odmítal pití. V 6 měsících byl poprvé hospitalizován v místě bydliště, na spádovém klinickém pracovišti a na naší klinice s neprospíváním (délka 70 cm, 60. percentil; hmotnost 6780 g, -1,96 SD; obvod hlavy 40,5 cm, -2,3 SD), známkami jaterního selhání (koagulopatie, hepatopatie, hepatomegalie, ascites) a známkami tubulární poruchy (hypofosfatemická křivice s klinickým nálezem rachitického růžence) *(viz obr. 2.2.1, tab. 2.2.1)*.

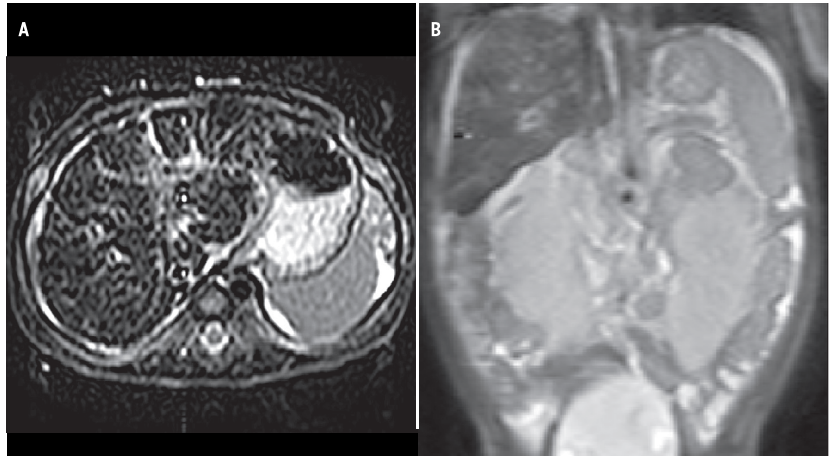
Byla zjištěna extrémně vysoká hodnota α_1-fetoproteinu v séru. MRI ukázala hepatomegalii, uzlovitou přestavbu jater s cirhotickou přestavbou *(viz obr. 2.2.2)*. Zobrazení dále prokázalo infiltrované zvětšené ledviny, paket uzlin v retroperitoneu při *truncus coeliacus* a *a. mesenterica superior*, lem volné tekutiny intraperitoneálně. Výsledky laboratorního vyšetření na úrovni metabolitů prokázaly na biochemické úrovni tyrosinemii typu I s vysokou hladinou aminokyseliny tyrosinu v séru, sukcinylacetonu v moči a zvýšené vylučování kyseliny δ-aminolevulové *(viz tab. 2.2.1)*. V moči byly zjištěny sekundární metabolity tyrosinu 4-hydroxyfenyllaktát, 4-hydroxyfenylpyruvát a N-acetyltyrosin. Molekulárně genetické vyšetření později diagnózu potvrdilo nálezem homozygotní sestřihové mutace c.554-1G>T; p.Lys186Serfs*199 v genu *FAH*, rodiče jsou heterozygoti.

Tab. 2.2.1 Patologické laboratorní hodnoty u chlapce s tyrosinemií typu I při manifestaci onemocnění ve věku 6 měsíců

Vyšetření	Hodnota	Norma
ALT (μkat/l)	1,39	≤ 0,6
AST (μkat/l)	4,63	≤ 0,6
ALP (μkat/l)	22,07	≤ 6,2
INR	3,6	0,8–1,2
APTT (s)	78,4	≤ 40
Antitrombin III (%)	40	90–130 %
Protein C (%)	< 10	70–125 %
α_1-fetoprotein (μg/l)	150 000	≤ 8,1
Vápník v séru (mmol/l)	1,88	2,0–2,75
Fosfor v séru (mmol/l)	0,42	1,16–1,9
Tyrosin (μmol/l)	488	30–180
Sukcinylaceton v moči (μmol/l)	614	≤ 2
Kyselina δ-aminolevulová v moči (mmol/mol kreatininu)	103	nedetekováno



Obr. 2.2.1 Chlapec s tyrosinemií typu I:
A) při manifestaci v 6 měsících (zobrazen rachitický růženec);
B) po transplantaci jater ve věku 2,5 roku.



Obr. 2.2.2 MRI jater u 12měsíčního chlapce s tyrosinemií typu I v transverzální (A) a frontální (B) rovině dokumentující hepatomegalii a uzlovitou přestavbu jater.
Velikost uzlů od 6 do 33 mm. Počínající cirhotická přestavba. Postkontrastně bez nápadnějšího sycení.
(S laskavostí poskytla Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a VFN v Praze.)

Po zavedení přísné nízkobílkovinné diety (0,5 g přirozené bílkoviny/kg/den) suplementované aminokyselinovým přípravkem bez aminokyseliny Tyr a Phe a po zavedení léčby nitisinonem došlo k rychlému poklesu hladin toxického sukcinylacetonu v moči (pod 2,0 μmol/l v průběhu prvních 3–4 dnů léčby) a poklesu hladin kyseliny δ-aminolevulové v moči (26 mmol/mol kreatininu po 4 dnech léčby). Trvaly však zatím známky jaterní nedostatečnosti (koagulopatie s nutností opakovaného podání plazmy, vysoká

potřeba podávané glukózy k udržení glykemie). Hladina α_1-fetoproteinu sice zprvu mírně poklesla (75 000 µg/l), ale při kontrole jsme zaznamenali opětovný vzestup jeho koncentrace (89 000 µg/l). Pro tubulopatii s projevy hypofosfatemické křivice byla do léčby zavedena suplementace aktivní formou vitaminu D_3 ($1,25(OH)_2D$), hypoglykemie se normalizovaly na frekventní stravě s přídavkem maltodextrinu.

UZ, CT a MRI vyšetření ukázala patologický nález v játrech s ložisky nodulární přestavby, paket uzlin v retroperitoneu s podezřením na onkologický proces. Chlapec byl proto přeložen na hematoonkologickou kliniku do FN Motol k laparoskopii a jaterní biopsii. V pravém laloku jater pod bránicí bylo nalezeno makroskopicky odlišné ložisko 2×3 cm. Histologické vyšetření prokázalo jaterní fibrózu, ale bez průkazu hepatocelulárního karcinomu.

V dalším průběhu se u chlapce pokračovalo v dietoterapii a podávání nitisinonu, přesto přetrvávalo neprospívání. Koagulopatie se sice upravila, nicméně stále byly zvýšené hladiny aminotransferáz (ALT 2,95 µkat/l; AST 2,42 µkat/l). Pravidelná metabolická vyšetření svědčila pro dobrou metabolickou kompenzaci s prakticky nedetekovatelnou hladinou sukcinylacetonu v moči. Postupně klesala hladina α_1-fetoproteinu, ale nikdy se zcela neupravila – ve věku 10 měsíců činily její hodnoty 26 481 µg/l (norma < 10), v roce věku 7718 a ve dvou letech 349.

Kontrolní ultrasonografická vyšetření břicha prokázalo nodulární přestavbu v obou jaterních lalocích, což spolu s rozvojem jaterní fibrózy a trvale vysokými hodnotami α_1-fetoproteinu svědčilo pro vysoké riziko rozvoje hepatocelulárního karcinomu. Chlapec splňoval mezinárodní indikační kritéria pro zařazení do transplantačního programu jater. Transplantace jater proběhla úspěšně ve věku 2,5 roku v pražském IKEM. Chlapec dostal II. a III. laterální segment jater od nepříbuzného zemřelého dárce. Histologické vyšetření odstraněných jater ukázalo přítomnost několika ložisek hepatocelulárního karcinomu.

Chlapec je nyní 10letý, výška i váha odpovídá 60. percentilu, obvod hlavy je na 3. percentilu. Jaterní funkce jsou normální, mentální vývoj je v hraničním pásmu, mírně opožděná je řeč a vývoj sociálního chování. Dlouhodobě je na terapii kyselinou acetylsalicylovou (25 mg), kyselinou ursodeoxycholovou (250 mg) a takrolimem. Terapii nitisinonem bylo možné ukončit.

Teoretická část

Etiologie

Příčinou tyrosinemie typu I (HT I) je deficit enzymu fumarylacetoacetáthydrolázy (FAH), který se nachází na úrovni posledního kroku přeměny tyrosinu na fumarát a acetoacetát. Incidence onemocnění se odhaduje na 1 : 125 000, dědičnost je autosomálně recesivní. Metabolický blok způsobuje hromadění fumarylacetoacetátu (FAA), který se přeměňuje na toxické metabolity sukcinylaceton (SA) a maleylacetoacetát (MAA). Postiženy jsou zejména hepatocyty, tubulární buňky ledvin a periferní nervstvo. Závažnou komplikací je rozvoj hepatocelulárního karcinomu. Inhibována je rovněž syntéza hemu na úrovni dehydratázy kyseliny δ-aminolevulové s příznaky odpovídajícími akutní porfyrii.

Klíčovým patolofyziologickým mechanismem je oxidativní stres a poškození DNA vysokou hladinou FAA a SA. Jakožto prekurzor dopaminu může vysoká koncentrace tyrosinu ovlivnit vzájemnou souhru neurotransmiterů. Bylo prokázáno, že FAA inhibuje řadu DNA glykosyláz, které jsou zásadní v procesu reparace DNA (BER – *base excision repair pathway*), a vede k závažné depleci glutathionu v buňce jeho přímým vyvazováním.

Klinické projevy

Onemocnění se klasicky manifestuje již v novorozeneckém nebo mladším kojeneckém věku (akutní typ), méně často mezi 6. a 12. měsícem (subakutní typ), vzácně později (chronický typ). Klinické projevy odpovídají jaternímu selhání, v mírnější podobě se u dětí manifestuje hepatopatie, hepatomegalie, koagulopatie, s možnou progresí až do jaterní cirhózy a/nebo hepatocelulárního karcinomu. Změny v zobrazení jater jsou v čase stanovení diagnózy přítomné až v 75 % případů, zejména se jedná o uzlovou přestavbu a cirhózu, v menším množství případů o karcinom. Krvácivé projevy jsou časté, naproti tomu ikterus a elevace jaterních testů jsou jenom mírné.

Děti neprospívají, jsou hypotonické. Může se objevit hypoglykemie. Přítomen může být zápach potu a moči po zelí (kyselina 2-hydroxybutyrová) nebo po žluklém másle (kyselina 2-oxo-4-methiolbutyrová). S onemocněním bývá spojeno rovněž renální postižení s rozvojem Fanconiho syndromu, tubulární acidózy, křivice, eventuálně glomerulosklerózy a nefrokalcinózy. I když renální postižení může klinické manifestaci dominovat, postižení jater je vždy přítomno.

Nejcharakterističtějším neurologickým projevem jsou porfyrii podobné příznaky, většinou vyvolané interkurentním infektem. Krize se projeví těžkou bolestí (v případě břicha mohou imitovat náhlou příhodu břišní), slabostí a změnami tonu autonomního nervstva (např. ataka hypertenze). Progresivní motorická polyneuropatie si v důsledku respiračního selhání může vynutit ventilační podporu. U chronického typu onemocnění se může rozvinout kardiomyopatie.

Diagnostika

Na biochemické úrovni diagnostika vychází z typických laboratorních projevů postižení jaterních a ledvinných funkcí (hepatopatie, hypoalbuminemie, koagulopatie, hyperfosfaturie, glukosurie, hyperaminoacidurie až charakteru Fanconiho syndromu). Hladina α_1-fetoproteinu je důležitým laboratorním markerem možného rozvoje hepatocelulárního karcinomu.

Zvýšená hladina aminokyseliny tyrosinu v séru a zvýšené vylučování sukcinylacetonu a δ-aminolevulové kyseliny močí stanoví diagnózu na biochemické úrovni. Definitivně je diagnóza potvrzena molekulárně genetickým vyšetřením genu *FAH*.

Léčba

Ihned po stanovení diagnózy by měla být zahájena léčba nitisinonem neboli 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyklohexandionem. Tento perorálně podávaný lék, který je na trhu od roku 1992, zásadně zlepšuje prognózu včas léčených pacientů s tyrosinemií typu I, protože významně snižuje riziko rozvoje hepatocelulárního karcinomu.

Efekt terapie jasně ukazují i výsledky u našich 12 pacientů s tyrosinemií typu I. Ze tří dětí, u kterých se onemocnění manifestovalo v době před podáním nitisinonu jaterním selháním, dvě děti zemřely pro hepatocelulární karcinom a jedno dítě na jaterní selhání s porfyrickou krizí. Tři pacienti byli transplantování pro rozvoj hepatocelulárního karcinomu (dva úspěšně, jeden chlapec zemřel na pozdní komplikace transplantace/karcinomu), zdravotní stav ostatních pacientů na kombinované nízkobílkovinové dietě a nitisinonu je uspokojivý.

Nitisinon zabraňuje tvorbě toxických metabolitů inhibicí enzymu 4-hydroxyfenylpyruvátdioxygenázy, metabolického kroku předcházejícího vzniku fumarylacetoacetátu (FAA). Zjednodušeně se tak závažná forma tyrosinemie typu I mění na mírnější formu tyrosinemie typu III. Začíná se s dávkou 1 mg/kg/den (v případech jaterního selhání

lze začít s dávkou až 2 mg/kg/den). Mezi vzácné nežádoucí účinky léku patří trombocytopenie, leukopenie, konjuktivitida a projevy tyrosinemie typu III jako fotofobie, korneální opacity, bolesti očí. Odpověď na terapii nitisinonem je většinou rychlá.

Součástí léčby je dieta s nízkým obsahem tyrosinu a fenylalaninu doplněná směsí esenciálních aminokyselin (0,5–1 g/kg/den). Hladiny tyrosinu v krvi by se měly pohybovat mezi 200 a 400 µmol/l (norma < 80). Dietu lze uvolnit po úspěšné transplantaci jater, o které je třeba uvažovat u všech pacientů s později stanovenou diagnózou (> 6 měsíců věku), přetrvávající elevací α_1-fetoproteinu a/nebo při nálezu nodulární přestavby jater.

Prognóza

Závisí na včasnosti diagnostiky i terapie. V řadě regionů v EU i USA byl proto rozšířen novorozenecký screening dědičných poruch metabolismu o tyrosinemii typu I s využitím měření SA. Děti, u kterých byla terapie zahájena opožděně, mají 12× vyšší riziko rozvoje hepatocelulárního karcinomu a 40× vyšší riziko rozvoje cirhózy ve srovnání s dětmi, které byly léčeny od novorozeneckého věku. Z evropského souboru 168 dětí s tyrosinemií typu I vyplývá, že transplantace jater byla indikována u 12 % z nich. Jaterní cirhóza byla zjištěna u 18 % pacientů a 2 % jich zemřela. Mentální vývoj je opožděný přibližně u jedné pětiny dětí.

Literatura:

1. de Laet C et al.: Recommendations for the management of tyrosinaemia type 1. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 8.
2. Jorquera R, Tanquay RM: The mutagenicity of the tyrosine metabolite, fumarylacetoacetate, is enhanced by glutathione depletion. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232(1): 42–48.
3. Mayorandan S et al.: Cross-sectional study of 168 patients with hepatorenal tyrosinaemia and implications for clinical practice. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 107.
4. Vondráčková A a kol.: Klinické projevy a výsledky metabolických a molekulárně genetických analýz u jedenácti dětí s tyrosinémií typu I. *Časopis lékařů českých* 2010; 149: 411–416.
5. Yngve T et al.: Fumarylacetoacetate inhibits the initial step of the base excision repair pathway: implication for the pathogenesis of tyrosinemia type I. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 773–778.

2.3 Homocystinurie

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Dívka se narodila z rizikové gravidity pro gestační diabetes u matky. Porod byl v termínu, spontánní, záhlavím, porodní hmotnost činila 4000 g a délka 52 cm. Pro ikterus byla 36 hodin na fototerapii. Kojena byla měsíc, na umělé mléčné výživě prospívala a psychomotorický vývoj odpovídal věku. V batolecím věku prodělala běžné respirační infekty, ale od předškolního věku byla na alergologii léčena inhalačními kortikoidy pro *asthma bronchiale*.

Ve školním věku byla sledována na dětské endokrinologii pro vysokou postavu a marfanoidní fenotyp. V 10 letech měřila 155 cm (> 95. percentil), naopak hmotnost činila jen 30,5 kg (< 1. percentil). Obvod hlavy 52 cm byl na 30. percentilu. Dívčina vysoká postava byla považována za familiární, protože její otec měří 192 cm, i když její matka měřila jen 164 cm. Mentální vývoj dívky byl v pásmu průměru, učila se dobře, na vysvědčení ve 4. třídě měla dvojku z matematiky, tělesné výchovy a pracovních činností. Neurologické vyšetření i EEG byly v normě, oční vyšetření neprokázalo ektopii čoček. Echokardiografické vyšetření prokázalo jen hraniční prolaps mitrální chlopně a zbytek *foramen ovale*. Výsledek vyšetření pomocí kostní denzitometrie odpovídal věku.

V rámci diferenciálně diagnostické rozvahy mezi Marfanovým syndromem a homocystinurií bylo doporučeno metabolické vyšetření. V plazmě byla nalezena vysoká hladina celkového homocysteinu (250 µmol/l, norma ≤ 12) a v séru vysoká hladina methioninu (341 µmol/l, norma 12–48). Normální hladiny vitaminu B_{12} a folátů v krvi nesvědčily pro sekundární hyperhomocysteinemii při vitaminovém deficitu. Molekulárně genetické vyšetření, které ukázalo, že dívka je v genu *CBS* složená heterozygotka pro patogenní mutace c.[833T>C]; [1126G>A]; p.[Ile278Thr]; [Asn376Asp], potvrdilo diagnózu dědičně podmíněné homocystinurie v důsledku deficitu cystathionin-β-syntázy (CBS).

Pro správnou léčbu pacientů s homocystinurií je nutné zjistit, zda se jedná o homocystinurii pyridoxin (vitamin B_6)-responzivní, nebo pyridoxin-rezistentní. U dívky jsme provedli diagnostický test s podáváním vysokých dávek pyridoxinu 3× 80 mg denně po dobu 3 týdnů. V souladu s výsledky molekulárních analýz, kdy je mutace c.833T>C asociována s pyridoxin-responzivní homocystinurií, ale mutace c.1126G>A je spojená s pyridoxinovou rezistencí, došlo jen k částečnému poklesu hladin homocysteinu (na 157 µmol/l) a methioninu (na 176 µmol/l).

Tím se prokázalo, že je třeba léčbu u dívky rozšířit o nízkobílkovinnou dietoterapii se sníženým příjmem methioninu (20 mg/kg/den, což odpovídá cca 0,7 g přirozené bílkoviny/kg/den) suplementovanou směsí esenciálních aminokyselin bez methioninu do celkového denního příjmu bílkovin 1,7 g/kg/den. Dívka navíc dostává vápník, vitamin D a jednou měsíčně i vitamin B_{12}. Matka byla zacvičena v dietoterapii, dívka dietu dobře snášela a hladina homocysteinu v její plazmě klesla na 50 µmol/l (doporučená hladina na léčbě je < 100 µmol/l, u pacientů s částečnou či plnou responzitivou na pyridoxin < 50). Pro dobrou metabolickou kompenzaci nebylo třeba terapii dále rozšiřovat, například o betain, který snižuje hladinu homocysteinu jeho zvýšenou remethylací zpět na methionin.

Celková úroveň intelektu při psychologickém vyšetření v 11 letech se pohybovala v hraničním pásmu při snížené performační složce. Schopnost krátkodobé slovně auditivní paměti a schopnost krátkodobého intenzivního soustředění byly nadprůměrné, zatímco vizuomotorická koordinace byla oslabená.

Při poslední kontrole ve věku 18,5 roku dívka měří 182 cm (98. percentil) a při váze 52,6 kg (3. percentil) je nápadně štíhlá až astenická (BMI 15,8) (*viz obr. 2.3.1*). Je na trvalé dietoterapii, subjektivně se cítí v pořádku a studuje jazykové gymnázium. Má mírnou skoliózu, pro kterou přechodně nosila korzet, ale nemá kloubní hypermobilitu. Pro nižší kostní denzitu (bederní páteř Z -1,9, celotělově -2,5) je u ní suplementován vápník a vitamin D. Má astigmatismus, oboustrannou korekci (+3,25 a -4 D). Podle posledního kardiologického vyšetření má trikuspidální regurgitaci 1. stupně a prolaps mitrální chlopně s regurgitacemi 2. stupně.

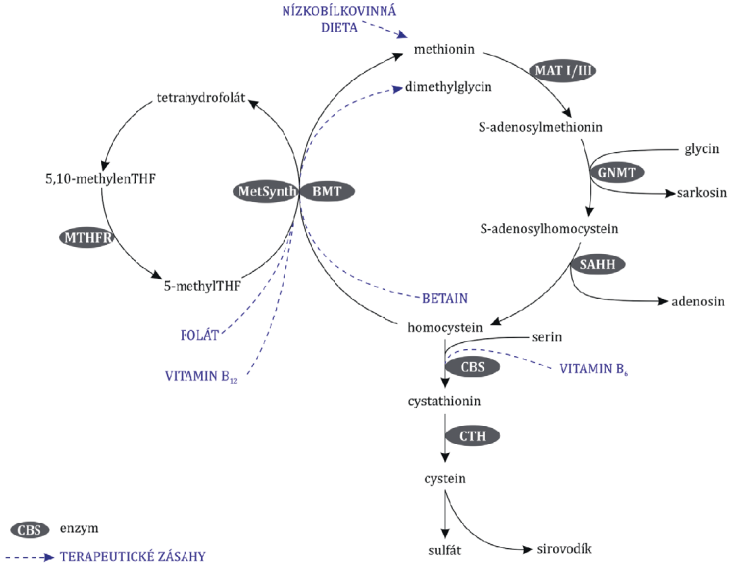
Obr. 2.3.1 **16letá dívka (se svou maminkou) s homocystinurií s marfanoidním habitem, skoliózou, deformitou hrudníku – *pectus excavatum***

Teoretická část

Etiologie

Homocystinurie z poruchy cystathionin-β-syntázy (CBS) je nejčastější dědičnou poruchou metabolismu sirných aminokyselin. Výskyt v Evropě se odhaduje na 1 : 6400 až 1 : 100 000 (v závislosti na způsobu diagnostiky), dědičnost onemocnění je autosomálně recesivní. Hlavním biochemickým příznakem je nahromadění homocysteinu v tkáních a krvi, které vede k tvorbě a vylučování jeho disulfidu, homocystinu. Nemoc byla identifikována v roce 1962 na základě screeningu aminokyselin v moči u pacientů s opožděním vývoje. CBS katalyzuje kondenzaci homocysteinu a serinu za vzniku cystathioninu. K této reakci jsou nutné tři kofaktory: hem, pyridoxal-5-fosfát a S-adenosylmethionin. Lze říci, že CBS řídí tok síry od methioninu k cysteinu, který je mimo jiné prekurzorem glutathionu, taurinu a sirovodíku *(viz obr. 2.3.2)*.

Z pohledu etiopatogeneze onemocnění se však nejedná pouze o problematiku vysoké koncentrace homocysteinu, methioninu a nedostatku cysteinu/sulfátů/sirovodíku, důležitá se zdá být i zvýšená koncentrace S-adenosylhomocysteinu (SAH), což negativně ovlivňuje methylační reakce. V organismu je známo > 60 SAM-dependentních methyltransferáz a vzniklé methylované produkty mající důležité funkce v buňce *(viz obr. 2.3.2)*. Metabolické změny u některých pacientů se výrazně zlepší po podání pyridoxinu (vitaminu B_6, prekurzoru pyridoxal-5-fosfátu), kdy dojde k poklesu homocysteinu a methioninu. Jedná se o tzv. pyridoxin-responzivní formu homocystinurie, která se vyskytuje především u nemocných s mutací c.833T>C; p.Ile278Thr, jež postihuje kolem 45 % všech patogenních alel u pacientů v Evropě. Nejčastější mutací, kterou označujeme jako pyridoxin-rezistentní, je c.[572C>T]; p.[Thr191Met] a c.[919G>A]; p.[Gly307Ser], jež je častá především ve Španělsku, Portugalsku a Latinské Americe.



Obr. 2.3.2 **Metabolismus sirných aminokyselin a mechanismus účinku některých látek používaných v terapii.** S-adenosylmethionin je donor methylové skupiny v řadě transmethylačních reakcí (> 60 enzymů), kvantitativně důležitá je například tvorba sarkosinu z glycinu, bazického myelinového proteinu, kreatinu, fosfolipidů a neurotransmiterů. Asi 50 % vytvořeného homocysteinu se mění zpět na methionin. Pro tuto reakci získá methylovou skupinu buď z 5-methyltetrahydrofolátu, nebo z betainu.

Pozn.: BMT = betain-homocystein S-methyltransferáza; **CBS** = cystathionin-β-syntáza; **CTH** = γ-cystathionáza; **GNMT** = glycin N-methyltransferáza; **MAT** = methioninadenosyltransferáza; **MetSynth** = methioninsyntáza; **MTHFR** = methylentetrahydrofolátreduktáza; **SAHH** = S-adenosylhomocysteinhydroláza.

Z klinických projevů se porucha CBS vyznačuje především dislokací očních čoček s těžkou myopií, opožděním vývoje, poruchami chování, tromboembolickými příhodami a změnami skeletu zahrnujícími osteoporózu, *genua valga*, ztenčení a prodloužení dlouhých kostí. Postižení pojiva a podobnost homocystinurie *(viz obr. 2.3.1 a 2.3.3)* s Marfanovým syndromem se na biochemické úrovni vysvětluje abnormální změnou přirozené struktury a redukcí disulfidových vazeb fibrilinu 1 danou sníženou koncentrací cysteinu (fibrilin 1 je bílkovina velmi bohatá na aminokyselinu cystein) a zvýšenou hladinou homocysteinu. Častý nález osteoporózy pak může být způsoben interferencí vysokých hladin homocysteinu (> 200 μmol/l) se syntézou a propojením řetězců kolagenu *(cross-linking)*.

Stále nejasná zůstává patofyziologie cévních příhod. Zvažována byla řada faktorů zahrnujících vliv krevních destiček, dopad na endotelové a neendotelové buňky cévní stěny i porucha srážlivosti. V současnosti nejvíce přijatelnou teorií je toxicita homocysteinu již při hodnotách > 100 μmol/l v indukci stresu endoplazmatického retikula *(unfolded stress response)* v endotelových buňkách a porušené nitrobuněčné signalizace. Mezi další možné etiopatogenetické mechanismy patří poškození vazodilatace při snížení hladiny oxidu dusnatého zvýšenou hladinou dimethylargininu nebo toxicita homocystein-thiolaktonu (Hcy-TL). Hcy-TL vzniká při chybném napojení homocysteinu

Po zvládnutí jaterního selhání a opakovaných transfuzích plazmy s parenterální výživou došlo během 2 týdnů k úpravě laboratorních nálezů, přetrvávalo jen zvýšené vylučování galaktitolu. Katarakta vymizela. Při převádění na perorální výživu byla u dívky zavedena přísná bezlaktózová dieta.

Nyní je dívce 9 let. Měří 133 cm (14. percentil), váží 29 kg (55. percentil), obvod hlavy činí 52 cm (35. percentil). Je na přísné bezmléčné a nízkogalaktózové dietě, která je suplementovaná vápníkem a speciální potravinou pro zvláštní lékařské účely, ve které je laktóza nahrazena glukózou. Navštěvuje 3. třídu základní školy, má normální neurologický nález, ale mentální úroveň je podle posledního psychologického vyšetření v pásmu podprůměru. Laboratorní vyšetření potvrdilo hypergonadotropní hypogonadismus, dívka bude výhledově potřebovat hormonální léčbu.

Teoretická část

Etiologie

Zvýšenou hladinu galaktózy může způsobit porucha jednoho ze tří enzymů, které se podílejí na metabolismu galaktózy. Nejčastější je porucha galaktóza-1-P-uridyltransferázy (GALT, galaktosemie typu I, klasická forma galaktosemie), která přeměňuje galaktóza-1-P a UDP-glukózu na glukóza-1-P a UDP-galaktózu. Dědičnost onemocnění je autosomálně recesivní. Obě ostatní poruchy metabolismu galaktózy, porucha galaktokinázy, která proměňuje galaktózu na galaktóza-1-P a ADP, a porucha galaktóza-4-epimerázy, která mění UDP-galaktózu na UDP-glukózu, jsou v naší populaci velice vzácné.

Klasická galaktosemie byla popsána v roce 1917 německým lékařem Friedrichem Goppertem, ale biochemická podstata nemoci byla objasněna až v roce 1956. S incidencí 1 : 42 500 je třetí nejčastější dědičnou poruchou metabolismu sacharidů po hereditární intoleranci fruktózy a souhrnném výskytu skupiny glykogenóz (laktózová intolerance se běžně neřadí mezi dědičné poruchy metabolismu sacharidů). V České republice již bylo diagnostikováno > 60 osob s galaktosemií.

Při poruše GALT dochází k akumulaci galaktózy, galaktitolu a galaktóza-1-fosfátu. Galaktitol, který je konečným produktem slepé cesty metabolismu galaktózy, špatně difunduje buněčnými membránami a působí jako osmoticky aktivní látka v oční čočce a tkáňově specifický toxin v mozku, játrech i ledvinách. Vysoké koncentrace galaktitolu, které byly nalezeny v mozcích zemřelých novorozenců s galaktosemií, způsobují cytotoxický edém mozku. Jeho akumulace v čočce zapříčiňuje kataraktu.

Vysoká koncentrace galaktóza-1-fosfátu blokuje řadu klíčových enzymů intermediárního metabolismu sacharidů. Galaktóza-1-P například inhibuje přeměnu glukóza-6-P na glukózu a anorganický fosfor, glykogenfosforylázu (metabolická cesta přeměny glykogenu na glukóza-1-P) a fosfoglukomutázu (obousměrná přeměna glukóza-1-P na glukóza-6-P) a poruchou funkce glykogenolýzy a glukoneogeneze vede k rozvoji závažné hypoglykemie. Porušená je i homeostáza fosforu, jenž je zvýšeně vylučován do moči při postižení ledvin a vyvazován ve vysoké míře ve formě galaktóza-1-P, který je zodpovědný za rozvoj závažné jaterní dysfunkce a porušené funkce tubulárních buněk ledvin.

Akumulace galaktózy, nedostatek UDP-galaktózy a inositolu (inhibice inositolmonofosfatázy 1 vysokou hladinou galaktóza-1-P) má závažný dopad na glykosylační reakce v organismu, které ovlivňují glykosylaci proteinů a lipidů. Bylo prokázáno, že pacienti s galaktosemií mají patologickou expresi řady genů podílejících se na řízení zánětlivé buněčné odpovědi. Byla například prokázána porušená funkce neutrofilních leukocytů pacientů s galaktosemií při inkubaci s galaktózou. Stupeň porušené funkce byl významnější u novorozeneckých leukocytů v porovnání s neutrofilními leukocyty starších pacientů. Na etiopatogenezi imunopatologie pacientů s galaktosemií se může podílet i hypoglykosylace imunoglobulinů a Fc receptorů.

Klinické projevy

U donošeného novorozence obvykle začínají mezi 3. a 10. dnem života apatií, zvracením, hepatomegalií a progredujícím ikterem. U nedonošených dětí, které jsou zpočátku jen na parenterální výživě, se onemocnění projeví až v průběhu převádění na mléčnou výživu. Konjugovaná hyperbilirubinemie zprvu nemusí dosahovat více než 20 % z celkové hladiny bilirubinu a tím se může oddálit rozpoznání závažného jaterního onemocnění.

K rychle progredujícímu rozvoji projevů sepse, edému mozku a jaternímu a renálnímu selhání s těžkou koagulopatií, oligourií až anurií a ascitem dochází v době, kdy postižené dítě vypilo sumárně 250–300 ml mateřského mléka (100 ml mateřského mléka obsahuje 7 g laktózy, tedy 3,5 g galaktózy). Ačkoli je závažnost hepatopatie, koagulopatie a hypoglykemie velká, hladina amoniaku v krvi je jen mírně zvýšená, což je důležitý laboratorní příznak pro diferenciálně diagnostickou rozvahu mezi galaktosemií a klinicky podobně probíhajícími poruchami cyklu močoviny, poruchami β-oxidace mastných kyselin a organickými aciduriemi, u kterých obvykle bývá v akutní fázi vysoká hyperamonemie.

Kromě ledvinného selhání může být přítomná tubulopatie s plně vyjádřeným obrazem Fanconiho syndromu. Specifická je predispozice k sepsi *Escherichia coli*, která se vyskytuje u 45 % případů. Průkaz infekčního *agens* v hemokultuře může vést k oddálení diagnózy galaktosemie. Znovuzavedení mateřského mléka po zlepšení klinického stavu a vyléčení sepse již většinou bývá pro novorozence fatální. V době stanovení diagnózy již často bývá přítomná katarakta (68 % případů). V případě časně zavedené terapie do 2 týdnů života katarakta může vymizet, jinak bývá nutná operace.

Dlouhodobou komplikací onemocnění je opoždění mentálního vývoje často doprovázené poruchou vývoje řeči se slovní dyspraxií a obtížemi při chápání mluveného slova. Mentální vývoj není zcela závislý na metabolické kompenzaci, polovina pacientů má IQ < 80 (30 % pak < 70). Dietou není ovlivnitelný ani hypergonadotropní hypogonadismus, který se rozvine u 90 % dívek (*viz tab. 4.1.2*). Zhruba u jedné třetiny pacientů se rozvine extrapyramidová a mozečková symptomatologie (dystonie, tremor a ataxie), 20 % pacientů v dospělosti – navzdory léčbě – trpí kataraktou a 30 % osteopenií až osteoporózou.

Tab. 4.1.2 Dlouhodobá prognóza u 130 pacientů s galaktosemií *(upraveno dle: Coss et al., 2013)*

Kognice	**IQ < 70** **IQ 70–79** **IQ 80–89** **IQ 90–109** **IQ 110–119**	31 % 26 % 25 % 12 % 7 %
Porucha řeči		50 %
Ataxie		6 %
Hypergonadotropní hypogonadismus u dívek		91 %
Osteopenie/osteoporóza		29 %
Katarakta		8 %

Často nepříznivá dlouhodobá prognóza postižených dětí souvisí s dopadem transplacentárního přenosu galaktózy na plod v průběhu těhotenství a také s endogenní syntézou galaktózy z glukózy v průběhu života, tzv. *self-intoxication*. Vlastní endogenní produkce galaktózy v průběhu dne činí u novorozence a kojence cca 41 mg/kg/den a u dospělého člověka 13 mg/kg/den, což značně převyšuje množství galaktózy obsažené ve výživě pacienta na dietě.

Diagnostika

V některých zemích je založena na novorozeneckém screeningu ze suché kapky krve. Na galaktosemii je nutno pomýšlet u každého novorozence se změnou chování a klinickými či laboratorními projevy hepatopatie, nefropatie nebo sepse nejasné etiologie. Pro diagnostiku je nutné vyšetření koncentrace galaktitolu v moči a koncentrace galaktózy a galaktóza-1-fosfátu v suché kapce krve.

Diagnózu je třeba potvrdit na enzymatické úrovni stanovením aktivity galaktóza-1-P-uridyltransferázy v izolovaných erytrocytech a nebo na molekulárně genetické úrovni vyšetřením genu *GALT*. Výsledky vyšetření z krevní kapky i enzymatické vyšetření v erytrocytech nelze interpretovat, pokud byl odběr proveden po transfuzi erymasy.

Léčba

Život zachraňujícím opatřením u novorozence s podezřením na galaktosemii je okamžité vysazení mléčné stravy až do okamžiku, kdy se podaří diagnózu vyloučit. Ve výživě dětí s galaktosemií se uplatňují potraviny pro zvláštní lékařské účely, které neobsahují laktózu a jen stopové množství galaktózy. Při přechodu na smíšenou stravu lze bez omezení zařazovat do jídelníčku pouze potraviny s obsahem galaktózy < 13 mg/100 g, výběr ostatních potravin je třeba zvažovat nebo omezovat, například větší množství ořechů, luštěnin i některých druhů zeleniny a ovoce. Obsah galaktózy ve vybraných potravinách je uveden v *tab. 4.1.3*. Obecně platí, že druhy ovoce a zeleniny, jež obsahují zrníčka, jadérka či slupky, mívají vyšší obsah galaktózy.

Galaktóza je i pro pacienta s galaktosemií esenciální monosacharid, podstatnou část denní potřeby galaktózy si organismus umí vyrobit. Denní tolerance pro množství galaktózy ve výživě kojence s galaktosemií se pohybuje mezi 50 a 200 mg denně, u starších dětí do 300 mg/den a u dospělých do 400–500 mg/den. Některá metabolická pracoviště však ve svých doporučeních pro pacienty s galaktosemií nejsou tak striktní. I když nedostatečná dietní *compliance* v dětském věku může být spojována s rozvojem katarakty a zhoršením biochemických parametrů, samotná dieta nejspíš nemá významný vliv na prognózu kognitivního postižení.

Tab. 4.1.3 **Obsah galaktózy v mg ve 100 ml vybrané výživy nebo 100 g potravin**
(zdroje: http://nutritiondata.self.com; http://wholefoodcatalog.info/nutrients)

Výživa/výrobek/potravina	Obsah galaktózy v mg ve 100 ml výživy nebo 100 g potravin
Mateřské mléko	3500
Mléko kravské	2500
Tvaroh nízkotučný	1836
Jogurt (3,5%)	1800
Parmazán	472
Sýr eidam	427
Hořká čokoláda	330
Čočka červená	303
Čočka hnědá	236
Hrášek zelený vařený	50
Vejce (žloutek/bílek)	16/0,3
Kiwi	42
Hrušky	17,6
Pomeranč	13,3
Jablka	3,1–7,1
Kapusta	42
Květák	25
Brokolice	15
Mrkev	13
Kukuřice	11
Mandle se slupkou	152
Ořech lískový	72
Chléb	12,5

Literatura:

1. Adam S et al.: How strict is galactose restriction in adults with galactosaemia? International practice. *Mol Genet Metab* 2015; 115: 23–26.
2. Coss KP et al.: Classical galactosaemia in Ireland: incidence, complications and outcomes of treatment. *J Inherit Metab Dis* 2013; 36: 21–27.
3. Coss KP et al.: Systemic gene dysregulation in classical galactosaemia: Is there a central mechanism? *Mol Genet Metab* 2014; 113: 177–187.
4. Kadarag N et al.: Literature review and outcome of classic galactosemia diagnosed in the neonatal period. *Clin Lab* 2013; 59: 1139–1146.
5. Leslie ND: Insights into the pathogenesis of galactosemia. *Annu Rev Nutr* 2003; 23: 59–80.
6. Liu Y et al.: N- and O-linked glycosylation of total plasma glycoproteins in galactosemia. *Mol Genet Metab* 2012; 106(4): 442–454.
7. Lynch LE et al.: Developmental outcomes of school-age children with Duarte galactosemia: a pilot study. *JIMD Rep* 2015; 19: 75–84.

4.2 Hereditární intolerance fruktózy

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Chlapec z prvního nekomplikovaného těhotenství nepříbuzných rodičů se narodil v termínu s dobrou poporodní adaptací, hmotností 3340 g a délkou 49 cm. Poprvé byl hospitalizován ve věku 6,5 měsíce pro zvracení, průjem a horečku. Tou dobou již byla přítomná hepatomegalie (+4 cm pod žeberní oblouk ve střední medioklavikulární čáře). Aminotransferázy byly výrazně zvýšené (ALT 27,3 μkat/l, norma ≤ 0,6; AST 34,7 μkat/l, norma ≤ 0,6), byla prokázána mírná hypoglykemie (2,5 mmol/l, norma 3,6–5,6), hypofosfatemie (0,8 mmol/l, norma 1,29–2,26), prodloužený aktivovaný parciální tromboplastinový čas (65 s, norma 30–40). Sérologické vyšetření bylo negativní a příčina hepatopatie se nezjistila. Laboratorní testy se během měsíce postupně upravily, opětovné zvýšení aminotransferáz však bylo zachyceno při infektu horních cest dýchacích ve věku 14 a 25 měsíců (ALT 9,38 a 12,47 μkat/l; AST 6,52 a 11,43 μkat/l).

Chlapec byl ve věku 2,5 roku doporučen k metabolickému vyšetření. Fyzikální vyšetření bylo bez patologického nálezu a odpovídalo věku. Antropometrické parametry byly v normě, výška 91 cm (20. percentil), hmotnost 15,3 kg (92. percentil) a obvod hlavy 50,5 cm (70. percentil). Laboratorní vyšetření ukázalo mírně zvýšené aminotransferázy (ALT 1,14 μkat/l, AST 1,53 μkat/l), naopak ostatní biochemická vyšetření byla v normě včetně gamaglutamyltransferázy, alkalické fosfatázy, bilirubinu, laktátdehydrogenázy, parametrů koagulace, amoniaku, hladiny α-1-antitrypsinu a ceruloplasminu. Sonografické vyšetření ukázalo difuzně zvýšenou echogenitu parechymu a objem jater byl na horní hranici normy.

Metabolické vyšetření neprokázalo zvýšené vylučování fruktózy do moči, ale anamnesticky byl nápadný údaj, že chlapec odmítá slazená jídla a ovoce. Proto jsme indikovali molekulárně genetické vyšetření genu *ALDOB* (aldoláza B), které prokázalo, že chlapec je složený heterozygot pro dvě patogenní mutace c.448C>G; p.Ala150Pro a c.524C>A; p.Ala179Asp a má hereditární intoleranci fruktózy.

Chlapci je nyní 14 let, je trvale na přísné dietoterapii bez ovoce, nedostává ani zeleninu s vyšším obvsahem fruktózy (*viz tab. 4.2.1*). Klinicky je až na mírnou hepatomegalii (+1,5 cm) v pořádku, růst i vývoj odpovídá věku, učí se dobře. Aminotransferázy nejsou zvýšené.

Teoretická část

Etiologie

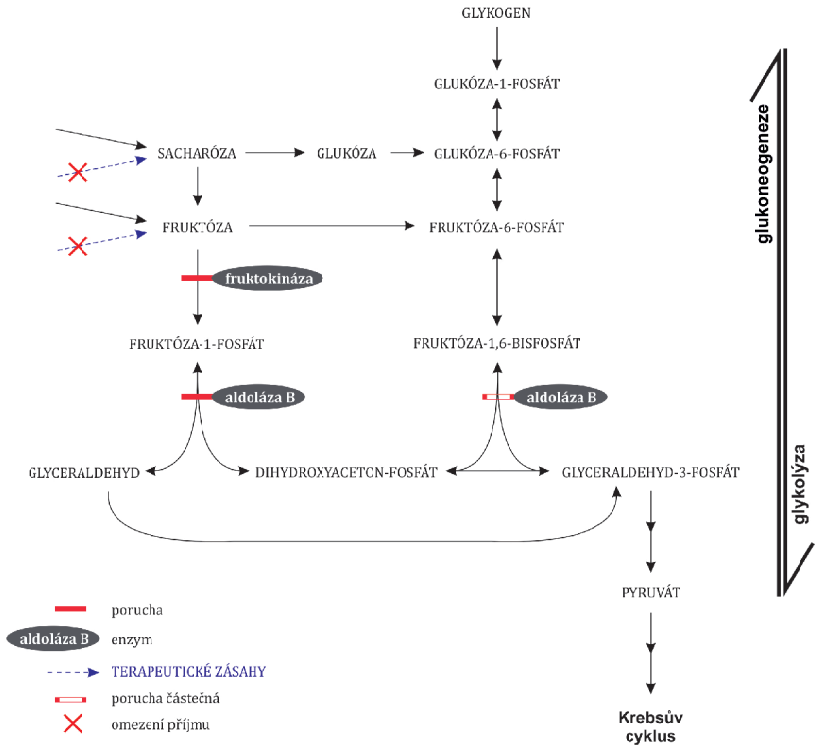
Hereditární intolerance fruktózy (HFI) je způsobena poruchou aktivity aldolázy B (AldoB, fruktóza-1,6-bisfosfát aldoláza B). Fruktoaldolázy jsou specifické enzymy katalyzující štěpení fruktóza-1,6-bisfosfátu a fruktóza-1-P na tříuhlíkaté cukry dihydroxyacetonfosfát, glyceraldehyd-3-P a glyceraldehyd. Tato enzymatická reakce zastává centrální místo v glykolýze a vzhledem k tomu, že se jedná o reakci reverzibilní (obousměrnou), také v glukoneogenezi.

Existují tři izoformy fruktoaldoláz: typ A je exprimován především ve svalu, typ B v játrech, ledvinách a tenkém střevě a typ C v mozku. Aldolázy A a C jsou exprimovány konstitučně, exprese typu B je v klidovém stavu nízká a zvyšuje se po příjmu sacharidů obsahujících fruktózu. Kromě rozdílné exprese má typ B podobnou afinitu k fruktóza-1,6-bisfosfátu jako k fruktóza-1-P, čímž se zásadně liší od obou ostatních izoforem,

Tab. 4.2.1 **Obsah fruktózy ve 100 g ovoce, ovocných nápojů a zeleniny**
(zdroje: http://nutritiondata.self.com; http://wholefoodcatalog.info/nutrients)

Ovoce a zelenina	Obsah fruktózy (g) ve 100 g
Med	39
Rozinky	33
Datle sušené	31
Křížaly	29
Fíky sušené	25
Marmelády	20
Hroznové víno	13,6
Sladké nápoje *(soft drinks)*	12,5
Švestky sušené	11
Šípky	8,7
Hrušky	7
Třešně	6,1
Jablka	6
Jablečný džus	5,3
Jahoda	5,3
Ananas	2–5
Banán	2–5
Maliny	2–5
Meloun	2–5
Pomeranč	2–5
Rybíz	2–5
Švestky	2–5
Broskve	1–2
Mandarinky	1–2
Rajčata	1–2
Brokolice	1–2
Cibule	1–2
Cuketa	1–2
Dýně	1–2
Mrkev	1–2
Papriky	1–2
Pórek	1–2
Zelí	1–2
Avokádo	< 1
Meruňky	< 1
Brambory	0,2
Špenát	0,1

jejichž afinita k fruktóza-1-P je nízká. Právě fruktóza-1-P je přitom hlavním intermediátem metabolismu fruktózy (*viz obr. 4.2.1*). Fruktóza-1-P vzniká z fruktózy činností fruktokinázy.



Obr. 4.2.1 Metabolismus fruktózy v jaterních buňkách.
Fruktóza je fosforylovaná hexokinázou či fruktokinázou. Dominantní úlohu hraje fruktokináza, která produkuje fruktóza-1-fosfát. Aldoláza B utilizuje fruktóza-1-fosfát pro další metabolické cesty v procesu glykolýzy a glukoneogeneze.

Dědičnost HFI je autosomálně recesivní a gen pro AldoB je lokalizován na chromosomu 9q22.3. V genu pro AlodB se v běloŝské populaci nacházejí tři prevalentní mutace, které se vyskytují skoro u 85 % pacientů. HFI patří při incidenci 1 : 20 000 mezi nejčastější dědičné poruchy metabolismu sacharidů. Deficit aldolázy A způsobuje glykogenózu typu XII, deficit aldolázy C zatím nebyl u lidí prokázán.

Klíčovým patofyziologickým mechanismem pro rozvoj onemocnění je akumulace fruktóza-1-P. Ten nemůže být metabolizován na fosfotriózy, které normálně vstupují do glykolýzy nebo glukoneogeneze. Nejenže tak vzniká menší množství substrátů pro obě reakce, ale fruktóza-1-P navíc inhibuje některé enzymy glykolýzy, glukoneogeneze a syntézy glykoproteinů, mezi které patří glukóza-6-P-isomeráza (přeměňuje glukóza-6-P na fruktóza-6-P), fruktóza-1,6-bisfosfát-aldoláza A (metabolizuje glyceraldehyd-3-P na fruktóza-1,6-bisfosfát) a fosfomanoisomeráza (podílí se na syntéze glykoproteinů katalyzujících konverzi fruktóza-6-P na manóza-6-P). Nedostatek fosforu vede k sekundární inhibici glykogenfosforylázy, čímž je narušena glykogenolýza, dochází i k energetické deprivaci buněk pro sníženou syntézu ATP.

Dále nelze pominout ani toxický efekt vysoké koncentrace fruktóza-1-P na buňky jater a ledvin. Vysoká koncentrace fruktóza-1-P stimuluje pyruvátkinázu s následným zvýšením hladin laktátu, pyruvátu a alaninu, které se podílejí na rozvoji metabolické acidózy. Vysoká hladina fruktóza-1-P a současná deplece ATP jsou považovány za příčinu hepatotoxicity a nefrotoxicity, jež se u pacientů s HFI mohou projevit jako akutní jaterní selhání nebo vyústit při progresivní poruše funkce proximálních tubulárních buněk až do obrazu plně vyjádřeného Fanconiho syndromu.

Klinické projevy

Jedinci s HFI jsou zcela asymptomatičtí až do momentu, kdy požijí fruktózu, sorbitol (E420) a/nebo řepný či třtinový cukr (sacharóza, disacharid fruktózy s glukózou). Mateřské mléko a většina umělých kojeneckých výživ obsahuje laktózu, proto se onemocnění neprojevuje u malých kojenců, pokud nedostávají čaj s cukrem. Výjimkou může být dřívější podání např. sójové výživy, která obsahuje sacharózu. S ohledem na poměrně malý obsah fruktózy v zelenině (*viz tab. 4.2.1*) a při možné denní toleranci příjmu fruktózy v rozmezí 1–3 g nebývají akutní klinické projevy onemocnění zpravidla pozorovány po zavedení zeleninových příkrmů. Onemocnění se obvykle projeví při zavádění ovocných příkrmů nebo po vypití většího množství slazených čajů a sladkých nápojů.

Sorbitol se vstřebává jen asi z 10–30 % a v játrech se promptně mění sorbitoldehydrogenázou na fruktózu, zatímco fruktóza z ovoce a stolního cukru se vstřebá 100%. S ohledem na možnost vstřebání malého množství fruktózy i z trisacharidu rafinózy, tetrasacharidu stachyózy a polyolů (například nízkokalorická sladidla a léčiva) prakticky není možné dosáhnout v potravě nižšího příjmu fruktózy než 2 g/den. Odhaduje se, že zdravé dítě na plné kojenecké výživě přijímá cca 20 g fruktózy a starší dítě až 100 g fruktózy denně.

U kojence s HFI, který sní během dne více než 5 g fruktózy, se objevuje nauzea, zvracení, zvýšená plynatost a úbytek na váze. Pokud příjem fruktózy ve stravě pokračuje, rozvíjí se hepatomegalie, hepatopatie a pomalu nebo rychle progredující jaterní selhání s ikterem, krvácivými projevy, apatií a křečemi, někdy i v kombinaci s renálním postižením s polyurií/oligurií. Rozvíjí se metabolická a laktátová acidóza s kompenzatorním Kussmaulovým dýcháním, hypermagnezemií a hypofosfatemií. Hypoglykemie může být symptomatická a může způsobit tachykardii, opocení, třes nebo křeče.

Pokud je denní příjem fruktózy u kojenců s HFI ještě vyšší (> 10 g), může onemocnění probíhat hyperakutně pod obrazem šoku nebo *Reye-like* syndromu. Naopak při dlouhodobém podávání nižších dávek fruktózy ve stravě se onemocnění projevuje kromě hepatomegalie a hepatopatie poruchou růstu a Fanconiho syndromem. Starší děti s HFI většinou mají na základě zkušeností s nauzeou a rekurentními bolestmi břicha nechutenství a averzi k ovoci a sladkým jídlům. U části z nich se může rozvinout chronická intoxikace fruktózou s růstovým selháním a hepatomegalií. Druhá část pacientů bývá při výrazném omezení fruktózy asymptomatická až do dospělosti, přičemž stanovení diagnózy HFI může napomoci až pozitivní rodinná anamnéza nebo absence zubního kazu.

Výsledky laboratorních vyšetření, které u pacientů s HFI závisejí na jejich aktuální zdravotní situaci, dokumentují různou tíži jaterního a renálního postižení, ataky hypoglykemie, občas též hypermagnezemii a hypofosfatemii. U jedinců se zvýšenou

fruktosurií je třeba v rámci diferenciálně diagnostické rozvahy pomýšlet i na **esenciální fruktosurii** (klinicky benigní onemocnění při poruše fruktokinázy). Poruchu fruktoaldoláz nelze zaměňovat za sníženou aktivitu sacharázy (sacharáza-isomaltáza; sukrázy) štěpící sacharózu na glukózu a fruktózu v kartáčovém lemu enterocytů a s fruktózovou malabsorpcí. Porucha absorpce fruktózy (*facilitated glucose/fructose transporter* GLUT5 při mutacích v genu *SLC2A5*) se projeví po požití fruktózy průjmem a bolestí břicha, ale nemá systémový dopad.

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření u dětí, u kterých se onemocnění projevilo v souvislosti s přechodem na výživu obsahující fruktózu či sacharózu. Na diagnózu HFI je nutno pomýšlet i u starších dětí a dospělých, kteří na cílený dotaz uvádějí, že se vyhýbají ovoci nebo sladkým jídlům. U pacientů v době klinických obtíží můžeme zjistit pozitivitu redukujících substancí v moči, zvýšenou koncentraci fruktózy v krvi a zvýšenou fruktosurii.

Diagnózu je nutno potvrdit na molekulární úrovni vyšetřením genu pro AldoB. V minulosti prováděný diagnostický test s fruktózou či sorbitolem se nepoužívá pro vysoké riziko fatálních komplikací.

Léčba

Terapie je dietní a spočívá v restrikci ovoce, sorbitolu, medu, řepného a třtinového cukru. Sladit lze glukopurem, přislazovat lze i nepolyolovými sladidly (aspartam, sacharin). Obsah fruktózy v běžně dostupném ovoci a zelenině je uveden v *tab. 4.2.1*. Pacienti s HFI obvykle tolerují 2–3 g fruktózy denně, pokud je toto množství rozděleno do více denních porcí. Denní příjem fruktózy ze zeleniny nemá překročit 1–1,5 g/den a příjem fruktózy z cerealií 1 g/den. Je třeba upřednostnit vařenou zeleninu, která obsahuje nižší množství fruktózy než zelenina syrová. S ohledem na nízký příjem vitaminu C je nutná jeho suplementace dle věku v dávce 50–150 mg denně. Kofaktorem fruktóza-1,6-bisfosfatázy je zinek, proto jsou pravidelné kontroly hladiny zinku důležité v rámci prevence jeho náhodného deficitu a dalšího snížení reziduální aktivity enzymu.

Literatura:

1. Bouteldja N, Timson DJ: The biochemical basis of hereditary fructose intolerance. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 105–112.
2. James CL et al.: Neonatal screening for hereditary fructose intolerance: frequency of the most common mutant aldolase B allele (A149P) in the British population. *J Med Genet* 1996; 33: 837–841.
3. Steinmann B et al.: Disorders of fructose metabolism. In: Scriver CR et al. (eds.): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (8th ed.). *McGraw-Hill*, 2001; 1489–1520.
4. Uldry M, Thorens B: The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Eur J Physiol* 2004; 447: 480–489.
5. Wong D: Hereditary fructose intolerance. *Mol Gen Metab* 2005; 85: 165–167.

4.3 Glykogenózy

Hana Kolářová, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

4.3.1 Glykogenóza typu Ia – von Gierkeho nemoc

Kazuistika

Dívka se narodila ve 39. týdnu těhotenství nepříbuzným zdravým rodičům jako druhorozené dítě. Její porodní hmotnost činila 2600 g (2,6. percentil) a délka 46 cm (2. percentil). 8 hodin po nekomplikovaném porodu s bezprostředně dobrou postnatální adaptací došlo k rozvoji apnoických pauz, které se opakovaly celkem 3×. V laboratorním nálezu dominovala těžká hypoglykemie (< 0,2 mmol/l, norma 2,2–4,2) s laktátovou acidózou (laktát 8,1 mmol/l, norma < 2,3; pH 7,30, norma 7,34–7,44; BE -14 mmol/l, norma 0 ± 2). Dívka byla přeložena na jednotku intenzivní péče, kde byla zahájena infuze s glukózou a bikarbonátem, díky které došlo k rychlé úpravě stavu.

Při postupném vysazování parenterálního přívodu glukózy s převedením na perorální léčbu se hypoglykemie již neopakovaly a dívka byla z nemocnice propuštěna 14. den života s diagnózou tranzitorní novorozenecké hypoglykemie. V domácí péči byla kojena po 3 hodinách a byla bez problémů. Kontroly glykemií u praktického lékaře byly sice v normě, ale nebyly měřeny nalačno před kojením. Teprve ve věku 7 týdnů byla zachycena glykemie 2,7 mmol/l (norma 3,3–5,4) a dívka byla odeslána k hospitalizaci. Fyzikální nález prokázal hepatomegalii (+3 cm pod žeberní oblouk).

Laboratorní vyšetření ukázalo normocytární anemii (Hb 90 g/l, Htc 0,25, MCV 96,9 fl), hepatopatii s mírnou cholestatickou složkou (AST 2,1 µkat/l, norma < 0,97; ALT 0,84 µkat/l, norma < 0,85; GGT 1,4 µkat/l, norma < 1,04), výraznou hypertriacylglycerolemii (10,9 mmol/l, norma < 2,2), hypercholesterolemii (5,3 mmol/l, norma < 4,2), hyperurikemii (455 mmol/l, norma < 240) a hyperlaktacidemii (7,4 mmol/l, norma < 2,3). Sonografické vyšetření potvrdilo hepatomegalii (index objemu jater 70, kontroly 55 ± 10) a nefromegalii (velikost ledvin 54 mm, kontroly 49 ± 3,4 mm) se zvýšenou echogenitou parenchymu obou orgánů.

Pro charakteristickou kombinaci klinických a laboratorních příznaků bylo vysloveno podezření na onemocnění ze skupiny glykogenóz (GSD). Molekulárně genetické vyšetření genu *G6PC* pro glukóza-6-fosfatázu ukázalo, že dívka má homozygotní mutaci c.247C>T; p.Arg83Cys, což potvrdilo diagnózu glykogenózy typu Ia – von Gierkeho nemoci. Oba rodiče jsou zdraví heterozygoti.

Léčba byla založena na frekventní výživě s pravidelným monitorováním glykemií. Během dne dívka dostávala každé dvě hodiny mateřské mléko a 20 ml bezlaktózového mléka obohaceného o 1 g maltodextrinu, aby denní příjem glukózy činil cca 10 mg/kg/min. V noci dostávala kontinuální výživu enterální pumpou, zpočátku nazogastrickou sondou a později perkutánní gastrostomií (PEG) (*viz obr. 4.3.1*). Podávali jsme bezlaktózové mléko v takové dávce, aby noční příjem glukózy činil 6 mg/kg/min. Dívka měla na dietním režimu normální glykemie, upravila se anemie a hypercholesterolemie a hladina triacylglycerolů klesla. Při terapii allopurinolem se upravila i hladina kyseliny močové.

Dívka je nyní 8letá (*viz obr. 4.3.2*), její hmotnost činí 24,5 kg (82. proporcionální percentil k výšce), výška 120 cm (5. percentil) a obvod hlavy 50 cm (17. percentil). Přes den je stále na frekventní výživě s maximálně tříhodinovou pauzou mezi jídly. Strava je nízkotučná se zvýšeným příjmem proteinů. V cukerné složce jsou preferovány polysacharidy s nízkým glykemickým indexem, naopak monosacharidy jsou v dívčině stravě

omezeny. Po každém jídle dostává nevařený kukuřičný škrob (2,5 g/kg/14 hod). Dívka dietu dobře toleruje a její příjem glukózy přes den činí cca 7 mg/kg/min. Od večera do rána má po dobu 10 hodin kontinuální výživu přes PEG s bezlaktózovým mlékem a přídavkem hroznového cukru (Glukopur) v takovém množství, aby příjem glukózy činil cca 2,7 mg/kg/min.

Při pravidelném monitorování glykemií byla u dívky několikrát zachycena asymptomatická hypoglykemie, především v průběhu akutní infekce. Její psychomotorický vývoj však probíhá harmonicky a kontrolní neurologická a EEG vyšetření jsou v normě. Trvá hepatomegalie (palpačně +3 cm) a nefromegalie (sonograficky > 97. percentil). Hladina cholesterolu je v normě, hladiny triacylglycerolu jsou vyšší (3,7 mmol/l, norma 1–1,6). S ohledem na antioxidační vlastnosti kyseliny močové udržujeme její hladiny mírně nad normou (375 µmol/l, norma < 340). V plánu je podávání modifikovaného škrobu s vyšším sytícím účinkem a schopností udržet normoglykemii po delší dobu, což může snížit frekvenci podávané stravy přes den a umožnit náhradu kontinuální noční výživy podáváním dvou nočních dávek.

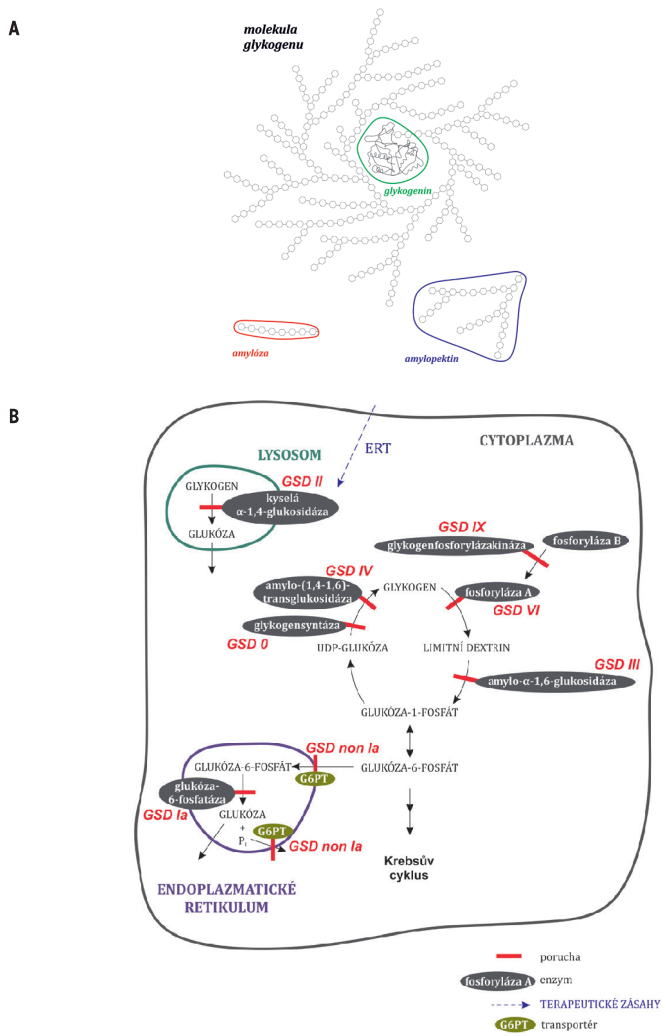
Obr. 4.3.1 **Výživová gastrostomie (PEG) zavedená u dívky s glykogenózou typu Ia ve věku 4 měsíců**

Obr. 4.3.2 **Dívka s glykogenózou typu Ia ve věku 8 let**

Teoretická část

Etiologie

Glykogenóza typu Ia (GSD Ia) je způsobena poruchou aktivity glukóza-6-fosfatázy (G6Páza), klíčového enzymu v regulaci glykemie, který přeměňuje glukóza-6-fosfát na glukózu *(viz obr. 4.3.3)*. Dědičnost onemocnění je autosomálně recesivní.



Obr. 4.3.3

A) Struktura glykogenu (zjednodušená).
Glykogen je zásobním polysacharidem obsahujícím cca 60 tisíc glukózových jednotek (30–120 tisíc). Molekuly glukózy jsou v glykogenu vázány dvěma typy glykosidových vazeb. Vazbou α(1→4) jsou tvořeny lineární řetězce, zde je patrná analogie s lineární molekulou amylózy, a vazba α(1→6) představuje místa větvení glykogenu, která se objevují každých 8–12 jednotek. Má tak podobnou strukturu jako amylopektin, ale je více větvený. Protein glykogenin plní funkci primeru, neboť syntéza glykogenu enzymem glykogensyntázou nemůže probíhat *de novo*.
B) Schéma metabolismu glykogenu v jaterní buňce.
Štěpení glykogenu probíhá v cytoplazmě, lineární části řetězce jsou štěpeny fosforylázou A. Větvící místa jsou odbourávána tzv. odvětvujícím enzymem (*debranching enzyme*; amylo-α-1,6-glukosidáza). Vytvořený

glukóza-1-fosfát se následně mění fosfoglukomutázou na glukóza-6-fosfát, který je důležitý jak v procesu glykolýzy, tak glukoneogeneze. V jaterních buňkách se glukóza-6-fosfát transportuje pomocí transportéru glukóza-6-fosfátu (G6PT) do endoplazmatického retikula, kde se činností glukóza-6-fosfatázy mění na volnou glukózu, která je následně uvolňována do krevního oběhu. Lysosomální kyselá α-1,4-glukosidáza se hlavní metabolické dráhy glykogenu neúčastní. Důvod, proč lysosomy normálně pohlcují a degradují glykogenová granula, není znám. Nejspíše k tomu dochází náhodně při autofagii glykogenových granul. Zisk volné glukózy při štěpení lysosomálního glykogenu je zanedbatelný pro udržování přiměřené hladiny glukózy.

Klinické a laboratorní projevy

První klinické projevy hypoglykemií a laktátové acidózy s atakami neklidu, tachypnoe/hyperpnoe či křečemi se mohou objevit již v novorozeneckém nebo raném kojeneckém věku, obvykle v závislosti na prodloužení intervalu mezi kojením. Zvlášť rizikové je noční lačnění. Hromadění glykogenu v játrech a ledvinách se projeví hepatonefromegalií a postižení střevní sliznice má za následek neprospívání na podkladě malabsorpce.

Neléčení pacienti mívají menší postavu, kulatý obličej s plnými tvářemi (tzv. obličej panenky – *doll-like face*) a zvětšené břicho, které kontrastuje s hubenými končetinami (*viz obr. 4.3.4*). Porucha růstu je zřetelná v období dospívání, u více než poloviny pacientů je opožděná puberta a kostní věk (*viz tab. 4.3.1*). Příčina poruchy růstu je multifaktoriální a zahrnuje vedle dietních faktorů i chronickou acidózu, hyperkortisolemii z opakovaných hypoglykemií a renální insuficienci.

Obr. 4.3.4 Chlapec s glykogenózou typu Ia ve věku 4 let s poruchou růstu, významnou hepatomegalií, zavedenou výživovou gastrostomií a venózním portem

Nedávné studie u zvířat potvrdily, že porucha G6Pázy způsobuje jaterní rezistenci vůči STH, která následně vede k poklesu IGF-1 potřebného pro růst a buněčnou proliferaci. IGF-1 se podílí i na správné osifikaci kostí.

U dětí s GSD Ia a poruchou růstu není indikovaná terapie růstovým hormonem. Léčba naopak spočívá ve správně vedené dietoterapii, protože porucha mineralizace s rozvojem osteopenie až osteoporózy vzniká především v důsledku chronické acidózy a nedostatečného příjmu vápníku a vitaminu D.

V laboratorním nálezu nacházíme kromě hypoglykemie i další doprovodné odchylky, které jsou podkladem dlouhodobých komplikací u pacientů s GSD Ia. Hyperlaktacidemie se rozvíjí na podkladě G6P enzymatického bloku. Při dlouhodobé svalové aktivitě vzniká laktát, který je po transportu do jater metabolizován na glukózu. Ta slouží jako další zdroj energie pro svaly, čímž opět dochází k produkci laktátu (tzv. Coriho cyklus). U pacientů s poruchou G6P se metabolismus (Coriho cyklus) obrací a vede k nahromadění laktátu vyrobeného nejen ve svalu, nově se přidává i jeho tvorba v játrech.

Hyperlipidemie je způsobená narušeným metabolismem cirkulujících lipoproteinů (vyšší lipidogeneze a snížené odstraňování lipoproteinů z krve kvůli nižší aktivitě lipoproteinové a hepatické lipázy) a inhibicí β-oxidace mastných kyselin prostřednictvím malonyl-CoA, jenž se hojně tvoří z acetyl-CoA. Udává se, že na hyperlipidemii se podílí i zvýšená hladina glukóza-6-P v jaterní tkáni, která způsobuje vyšší transkripci lipidogenních genů. Zvýšená hladina sérových lipidů s sebou nese riziko rozvoje dalších komplikací, jakými jsou akutní pankreatitida, cholelitiáza či ateroskleróza. Krvácivé komplikace, jako jsou například rekurentní epistaxe, se také přičítají porušenému složení lipidů v membránách trombocytů. Hyperurikemie vzniká na podkladě kompetitivní inhibice exkrece kyseliny močové v tubulech ledvin laktátem a přispívá k ní i zvýšená degradace nukleotidů v játrech. U neléčených pacientů vzniká dna a nefrolitiáza, na níž se podílí rovněž hyperkalciurie a hypocitraturie.

U dospělých pacientů často dochází k rozvoji jaterních adenomů, jejich prevalence dosahuje ve čtvrtém deceniu > 80 %. Adenomy se v polovině případů zvětšují, zmnožují a vytvářejí nerovný povrch a tuhost jater. Rozvoj hepatocelulárního karcinomu je méně častý, prevalence v jednotlivých souborech se pohybuje mezi 0 a 11 %. Jaterní adenomy secernují hormon hepcidin, který způsobuje obraz mikrocytární anemie. Na rozvoji anemie se však může podílet i nesprávná výživa, onemocnění ledvin, krvácivá diatéza a samotná chronická povaha jaterního a střevního postižení.

U pacientů s GSD Ia se často vyskytují také renální komplikace. Nefromegalie a nefrolitiáza již byly zmíněny výše, ty však patří mezi preventabilní komplikace, které lze významně ovlivnit důslednou dietní léčbou a pomocí inhibitorů xanthinoxidázy či kaliumcitrátu. Pro pacienty s GSD Ia je především riziková glomerulární hyperfiltrace, mikroalbuminurie a proteinurie, jež mohou vyústit až v ledvinné selhání.

V naší ambulanci je v současné době léčeno 8 pacientů s GSD Ia, jeden zemřel na hepatocelulární karcinom. Klinická a laboratorní data pacientů s GSD Ia a GSD non-Ia ve srovnání s literárními údaji jsou uvedena v *tab. 4.3.1.*

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření, zejména u pacientů s hepatomegalií, hepatopatií a atakami neketotických či hypoketotických hypoglykemií. Hypoglykemie jsou hypoketotické pouze u tohoto typu jaterní glykogenózy a vyžadují diferenciálně diagnostickou rozvahu s poruchami β-oxidace mastných kyselin. Vysvětlením je snížená produkce ketolátek při inhibici β-oxidace mastných kyselin prostřednictvím malonyl-CoA,

který vzniká ve zvýšené míře z akumulovaného acetyl-CoA. Specifická diagnostika je založená na molekulárně genetické analýze genu *G6PC*.

Tab. 4.3.1 Klinické projevy 13 českých pacientů s glykogenózou typu I ve srovnání se zahraničními studiemi

Studie počet pacientů	**Náš soubor (GSD I)[6)]** 13	**Rake et al., 2002 (GSD I)[4)]** 288
GSD Ia/non-Ia	9/4	231/57
Pohlaví (Ž/M)	4/9	164/124
Průměrný věk manifestace	5,6 měsíce	5 měsíců
První příznak		
hepatomegalie*)	45 %	83 %
hypoglykemie/laktátová acidóza	82 %	71 %
neprospívání/malý vzrůst	10 %	25 %
svalová hypotonie	0 %	13 %
Laboratorní nálezy		
hypercholesterolemie	73 %	53,4 %
hypertriacylglycerolemie	100 %	14 %
hepatopatie	82 %	–
hyperurikemie	91 %	57 %
anemie	82 %	60 %
krvácivost	13 %	23 %
Přirozený průběh		
hepatomegalie	91 %	89 %
nefromegalie	64 %	–
jaterní adenomy	27 %	16 %
hepatocelulární karcinom	8 %	0 %
mikroalbuminurie a proteinurie	44 %	44 %
nízký vzrůst	80 %	59 %
opožděná puberta	50 %	62 %
obezita	36 %	–
Specifické komplikace (GSD non-Ia)	**náš soubor**	**Visser et al., 2000[5)]**
počet pacientů	4	57
neutropenie	100 %	95 %
rekurentní infekce	75 %	100 %
nespecifické střevní záněty	50 %	77 %

Pozn.:

6) Pacienti sledovaní v ÚDMP a na KDDL 1. LF UK a VFN v Praze.

*) Významná, vedoucí k distenzi břicha.

Léčba

Spočívá především v dodržování antihypoglykemického režimu. Udržení dlouhodobě stabilní glykemie je dosaženo pomocí frekventní výživy obohacené o nevařený kukuřičný škrob, který vzhledem k nízkému glykemickému indexu přispívá k pomalému uvolňování glukózy. U kojenců a malých batolat se pro nízkou aktivitu pankreatické amylázy používá maltodextrin s dextrózovým ekvivalentem 5–8 % (dextrózový ekvivalent zjednodušeně vyjadřuje podíl volné glukózy v polysacharidové/škrobové sušině).

Noční výživa prostřednictvím nazogastrické sondy/gastrostomie zajišťuje kontinuální přísun sacharidů v podobě bezlaktózového mléka obohaceného o glukózu. Noční kontinuální výživa se obvykle zahajuje hodinu po posledním večerním jídle a ráno po odpojení musí ihned následovat snídaně, jinak hrozí rozvoj hypoglykemie (po kontinuální noční výživě je vyplavený inzulin). Denní potřeba glukózy u pacientů s GSD Ia s věkem klesá. Ve výživě je třeba omezovat obsah monosacharidů i disacharidů, neboť vedou ke zhoršení laktátové acidózy, rychle zvyšují glykemii a následně též inzulin. Výjimkou je podávání přesně definovaného množství hroznového cukru v bezlaktózovém mléku kontinuálně do zažívacího traktu v průběhu noci. Navíc se v léčbě používají i škroby, což by bez omezení disacharidů zvyšovalo riziko rozvoje obezity.

Pro hyperlipidemii je vhodné snižovat ve stravě rovněž příjem živočišných tuků včetně mléka, což může vést k nedostatečnému příjmu vápníku. Proto se u pacientů s GSD Ia doporučuje suplementovat vápník a vitamin D i další látky (např. vitamin C, LC-PUFA – polynenasycené mastné kyseliny s dlouhými řetězci). Intenzivní celoživotní dietní léčba zlepšuje metabolickou kompenzaci a vede tak ke snížení morbidity, mortality i k celkovému zvýšení kvality života.

Nedávno se na trhu objevil speciální modifikovaný škrob, který je vyroben ze speciálních voskem potažených zrn obsahujících pouze větvený amylopektin. Tento speciální škrob pomáhá některým pacientům udržet normoglykemii až 8 hodin (na rozdíl od 4–5 hodin u kukuřičného škrobu) a díky nízkému glykemickému indexu snižuje i postprandiální hyperglykemii.

Literatura:

1. Brooks ED et al.: Pathogenesis of growth failure and partial reversal with gene therapy in murine and canine glycogen storage disease type Ia. *Mol Genet Metab* 2013; 109: 161–170.
2. Kishnani PS et al.: Diagnosis and management of glycogen storage disease type I: a practice guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med* 2014; 16: e1–e29.
3. Martens DH et al.: Renal function in glycogen storage disease type I, natural course, and renopreservative effects of ACE inhibition. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 1741–1746.
4. Rake JP et al.: Glycogen storage disease type I: diagnosis, managment, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl. 1): S20–S34.
5. Visser G et al.: Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *J Pediatr* 2000; 137: 187–191.

4.3.2 Glykogenóza typu non-Ia

Kazuistika

Chlapec se narodil ve 38. gestačním týdnu císařským řezem pro alteraci ozev, ale bezprostřední postnatální adaptace byla v pořádku. Porodní hmotnost i délka byly v normě (3850 g, 50 cm). Ve věku 2 měsíců byl chlapec hospitalizován na dětském oddělení pro akutní bronchopneumonii. Při biochemickém vyšetření byla zjištěna hypoglykemie (2,7 mmol/l, norma > 3,3), pro kterou byl doporučen k metabolickému vyšetření. Ještě před překladem však v průběhu horečnatého infektu upadl do bezvědomí a rozvinuly se u něj tonicko-klonické křeče, po kterých byla zjištěna těžká hypoglykemie (< 0,1 mmol/l), hyperurikemie (420 µmol/l, norma < 340), hypertriacylglycerolemie (3,3 mmol/l, norma < 2,2) a elevace aminotransferáz (ALT 1,68 µmol/l, norma < 0,85; AST

1,68 μkat/l, norma < 0,97). Chlapec měl neutropenii (absolutní počet neutrofilních granulocytů 468 × 10^6/l, norma > 1500) a mikrocytární anemii (Hb 87 g/l, norma > 90; hematokrit 0,25, norma > 0,28; MCV 70 fl, norma > 77).

V klinickém vyšetření byla patrná hepatomegalie (+5 cm pod žeberní oblouk). Sonografie ukázala hraničně zvýšenou velikost ledvin s hyperechogenním parenchymem. Jaterní biopsie prokázala střádání glykogenových partikulí v cytoplazmě hepatocytů. Diagnóza glykogenózy typu non-Ia byla potvrzena molekulárně genetickým vyšetřením, které ukázalo, že chlapec je v genu *SLC37A4* homozygot pro patogenní mutaci c.1042_1043delCT; p.Leu348Valfs*53.

Byla zahájena terapie pomocí faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF, filgrastim), která vedla k úpravě parametrů krevního obrazu. S ohledem na extrémní hypergamaglobulinemii nebyl filgrastim podáván trvale, ale pouze intermitentně v době infekcí. Přes den byla u chlapce zavedena frekventní výživa po 2,5–3 hodinách mlékem bez laktózy, která byla suplementována 3 g maltodextrinu do každé dávky, aby denní příjem glukózy činil cca 12 mg/kg/min. V noci dostával kontinuální výživu do gastrostomie pomocí enterální pumpy v dávce cca 9 mg glukózy/kg/min.

Přes správně nastavenou dietní terapii byla metabolická kompenzace onemocnění zpočátku obtížná a u chlapce byly opakovaně zachyceny asymptomatické hypoglykemie, především v průběhu častých infekčních onemocnění (otitidy, aftózní stomatitidy, pyelonefritidy, a dokonce i pneumocystová pneumonie). Opakované hypoglykemie byly pravděpodobně i příčinou postupného zaostávání psychomotorického vývoje. Chlapec byl neobratný, do sedu se přitahoval v 7. měsíci, seděl od 9. měsíce, první samostatné kroky udělal až v roce a půl a vývoj řeči byl opožděný.

V batolecím veku se u chlapce prohlubovala porucha růstu a mikrocefalie. Ve 4 letech měřil 90 cm (< 1. percentil), vážil 13,1 kg a obvod hlavy činil 48 cm (< 3. percentil). Hladina IGF-1 byla nízká (28 μg/l, norma > 71) a při spontánní hypoglykemii (2,6 mmol/l) byla zachycena i nízká hladina růstového hormonu (2,6 μg/l, norma > 10). Bylo doporučeno endokrinologické vyšetření ve Fakultní nemocnici Motol, kde potvrdili deficit růstového hormonu pomocí stimulačního testu s pyridostigmin-klonidinem, při kterém hladina STH stoupla z 1,4 μg/l pouze na 3,2 μg/l (norma > 10 μg/l). Proto byla doporučena terapie růstovým hormonem v dávce 0,1 IU/kg/den. Současně byla zjištěna i hypotyreóza na podkladě chronické lymfocytární tyreoiditidy. Růstové tempo se na kombinované terapii zlepšilo, ale chlapec již růstový deficit nedohnal.

Pacient si po nástupu do školy začal stěžovat na kolikovité bolesti břicha a průjmovité stolice s příměsí hlenu. V perianální oblasti se rozvinul absces, který si vyžádal opakované chirurgické ošetření. První kolonoskopické vyšetření bylo ještě v pořádku, později však došlo k rozvoji *Crohn-like* nemoci. Sonografické vyšetření ukázalo ztluštění stěny střevní v oblasti céka a *colon ascendens* a histologické vyšetření střevní sliznice odebrané při kontrolní kolonoskopii potvrdilo ložiska lymfoplazmocytové infiltrace ve slizničních kryptách. V terapii byly navýšeny dávky G-CSF a byl přidán mesalazin, po kterém došlo k úpravě stavu i ultrasonografického obrazu.

Chlapcův stav se ve věku 9 let zkomplikoval otoky dolních končetin i skrota a rychle progredujícím ascitem. V moči byla masivní proteinurie charakteru nefrotického syndromu dosahující až 21 g/24 hod. Byla indikována biopsie ledviny, která odhalila souběh dvou onemocnění – glykogenózy (ložiskovité střádání PAS+ látek a vodojasné tubuly) a glomerulosklerózy. Při terapii kortikoidy a inhibitory ACE došlo ke snížení proteinurie na 3–4 g/24 hod, která však již dále neklesala. Rozvinulo se chronické selhání ledvin III. stupně, chlapec je kortikodependentní. Bolesti v oblasti bederní a hrudní páteře si vynutily rentgenové snímkování, jež zobrazilo četné kompresivní fraktury obratlů v těchto oblastech. Denzitometrické vyšetření prokázalo sníženou denzitu bederní páteře již v pásmu osteoporózy (Z-skóre -2,0). Na terapii bisfosfonáty došlo k ústupu bolesti. Psychologické vyšetření ve 13 letech prokázalo intelekt v pásmu lehké mentální retardace (IQ 65 bodů).

V současné době je pacientovi 20 let. Jeho hmotnost činí 67 kg a BMI 24,6. I když měl opožděnou pubertu a rostl až do 19 let, jeho konečná výška 165 cm je hluboko pod původní predikcí 181,5 ± 8 cm podle výšky obou rodičů. V klinickém nálezu dominuje hepatomegalie (+4 cm) a chronické selhání ledvin III.–IV. stupně. Hodnoty krevního tlaku jsou díky terapii v mezích normy. Mentální vývoj je opožděný; dle posledního psychologického vyšetření se IQ pohybuje v pásmu lehké mentální retardace, nejvíce je postižena složka řeči. V laboratorním nálezu trvá hyperproteinurie (2,5 g/l) a zvýšená hladina močoviny (15,2 mmol/l, norma < 8) a kreatininu (205 μmol/l, norma < 110). V krevním obrazu při léčbě s filgrastimem je absolutní počet neutrofilních granulocytů 1860 × 10^6/l (norma > 1500). Celkový cholesterol je v normě, ale triacylglyceroly jsou zvýšené (4,77 mmol/l, norma < 1,7). Hladina kyseliny močové v krvi je díky terapii allopurinolem v normě (360 μmol/l, norma < 420).

Je trvale na frekventní výživě s přídavkem kukuřičného škrobu přes den a od večera do rána má kontinuální výživu enterální pumpou se sójovým mlékem a přídavkem hroznového cukru v dávce 1,4 mg glukózy/kg/min. Podstupuje substituční terapii tyreoidálními hormony a pro opakované infekce v dutině ústní *(viz obr. 4.3.6)* dostává intermitentně i filgrastim.

Obr. 4.3.6 Recidivující aftózní stomatitida u chlapce s GSD non-Ia

Teoretická část

Etiologie

V endoplazmatickém retikulu (ER) jater, ledvin a střeva vzniká z glukóza-6-P glukóza prostřednictvím glukóza-6-fosfatázy (G6P-α). Naopak v ER v ostatních tkáních včetně neutrofilních granulocytů a makrofágů je tento enzymatický krok uskutečňován pomocí G6P-β. Mutace v genu pro G6P-α mohou způsobit glykogenózu typu Ia a mutace v genu pro G6P-β vyvolávají těžkou kongenitální neutropenii, bez jaterního postižení.

Glykogenóza typu non-Ia (GSD non-Ia) vzniká na podkladě mutace v genu *SLC37A4* kódujícím transportér glukóza-6-P (G6PT) lokalizovaném na membráně ER a je pojítkem mezi oběma výše uvedenými poruchami. GSD non-Ia (původně glykogenóza typu Ib) se považuje i za hlavní příčinu vzniku dalších typů glykogenóz této skupiny (GSD Ic a Id).

Klinické a laboratorní projevy

Pacienti s GSD non-Ia mají obdobné klinické a biochemické příznaky jako pacienti s GSD Ia (*viz kap. 4.3.1*), ale průběh onemocnění je navíc komplikován neutropenií, poruchou funkce neutrofilních granulocytů a chronickým střevním zánětem (*Crohn-like disease*).

Neutropenie (definovaná jako absolutní počet neutrofilních granulocytů < 1500 × 10^6/l) byla nalezena u více než 95 % pacientů s GSD non-Ia, u dvou třetin z nich se manifestovala již v prvním roce života. Neutropenie je obvykle intermitentní, trvalá je pouze u 9 % případů. U všech pacientů je zároveň porušená funkce neutrofilních granulocytů. Při defektu transportéru (G6PT) dochází k poruše až bloku cirkulace volného glukóza-6-P mezi cytoplazmou a ER. G6PT-deficitní neutrofilní granulocyty mají porušenou energetickou homeostázu, snížený příjem glukózy, glukóza-6-P, laktátu, ATP a NADP. Jejich schopnost chemotaxe, mobilizace kalcia a respiračního vzplanutí jsou významně narušené a navíc se zvyšuje i oxidativní stres, který vede k jejich zvýšené apoptóze.

Neutropenie má za následek zvýšené riziko infekcí, které mohou být svým průběhem či etiologií i dosti netypické (např. pneumocystové pneumonie). Mezi nejčastější infekce patří aftozní stomatitidy a záněty středouší, které se u více než poloviny pacientů s GSD non-Ia opakují několikrát ročně (*viz obr. 4.3.6*), respirační infekce se vyskytují u 42 % pacientů, kožní infekty u 37 %, včetně hlubokých kožních abscesů u 5 %, uroinfekce u 21 % a infekce gastrointestinálního traktu u 18 %.

Chronický střevní zánět (IBD) obdobný Crohnově nemoci se rozvíjí u 77 % pacientů s GSD non-Ia. Je způsoben dysbalanci imunitního systému a zánětlivými procesy ve střevní stěně při neutropenii, přesná patogenetická vazba však není jasná. Chronický zánět může postihovat kteroukoli část gastrointestinálního traktu, na jeho průběh může upozornit rozvoj periorálních (65 %) a perianálních (47 %) lézí, častý je i protrahovaný chronický průjem (40 %). V poslední době se udává, že u pacientů s GSD non-Ia je vyšší i výskyt jiných autoimunitních chorob, například chronické autoimunitní tyreoiditidy. Vybraná klinická a laboratorní data pacientů s GSD Ia a GSD non-Ia ve srovnání s literaturou jsou uvedena v *tab. 4.3.1*.

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření, diagnózu je nutno potvrdit molekulární analýzou genu *SLC37A4*.

Léčba

Dietní terapie je obdobná té u pacientů s GSD Ia. U nemocných s GSD non-Ia se navíc podává faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF), který významně snižuje frekvenci infekcí. Může se podávat intermitentně, ale častěji je doporučována každodenní aplikace. Nežádoucím účinkem léčby G-CSF je splenomegalie a vedlejším efektem může být i výrazná hypergamaglobulinemie. Léčba chronického střevního zánětu je obdobná terapii u pacientů s IBD.

Literatura:

1. Jun HS et al.: Molecular mechanisms of neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type Ib. *Blood* 2014; 123: 2843–2853.
2. Rake JP et al.: Glycogen storage disease type I: diagnosis, managment, clinical course and outcome. Results of the European Study on Glycogen Storage Disease Type I (ESGSD I). *Eur J Pediatr* 2002; 161(Suppl. 1): S20–S34.
3. Veiga-da-Cunha M et al.: How many forms of glycogen storage disease type I? *Eur J Pediatr* 2000; 159: 314–318.
4. Visser G et al.: Neutropenia, neutrophil dysfunction, and inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib: results of the European Study on Glycogen Storage Disease type I. *J Pediatr* 2000; 137: 187–191.

4.3.3 Glykogenóza typu III – Coriho nemoc, Forbesova nemoc

Kazuistika

Chlapec se narodil v termínu zdravým nepříbuzným rodičům. Porodní hmotnost dosahovala 3190 g (45. percentil), délka 49 cm (17. percentil); rodinná anamnéza je nevýznamná, sourozence nemá. V somatickém nálezu dominovalo již od časného kojeneckého věku prominující bříško a obličej panenky (tzv. *doll-like face*). Psychomotorický vývoj byl od počátku mírně opožděný (lezl od 15 měsíců, stavěl se od 18 měsíců, první slova používal v 18 měsících a spojoval je do vět od 3,5 roku).

Ve věku 9 měsíců byl chlapec hospitalizován pro akutní dehydrataci při rotavirové gastroenteritidě. Během pobytu v nemocnici byly opakovaně zachyceny hypoglykemie dobře korigovatelné běžnými dávkami glukózy v infuzi. Pro výraznou hepatopatii s mírnou hyperlipidemií byl přeložen na naše pracoviště. V laboratorním vyšetření byly zjištěny opakované hypoglykemie v brzkých ranních hodinách (2,1 mmol/l, norma > 3,3) doprovázené ketonurií, dále zvýšené hodnoty jaterních testů (ALT 31,15 µkat/l, norma < 0,85; AST 25,4 µkat/l, norma < 0,97; GGT 5,44 µkat/l, norma < 1,04), hyperlipidemie (triacylglyceroly 8,98 mmol/l, norma < 2,22; cholesterol 11,52 mmol/l, norma < 4,2) a elevace svalových enzymů (kreatinkináza 11,01 µkat/l, norma < 2,44) s normální hladinou myoglobinu v krvi. Hladiny kyseliny močové byly v normě. Koncentrace laktátu v krvi byla mírně zvýšená (3,0 mmol/l, norma < 2,3).

V klinickém nálezu patrná významná distenze bříška s játry zasahujícími až do oblasti malé pánve vpravo (+15 cm), výrazně zvětšený byl i levý lalok. Váhově chlapec dobře prospíval i rostl (hmotnost 9800 g, 55. proporcionální percentil; délka 74,5 cm, 50. percentil; obvod hlavy 45 cm, 23. percentil). V neurologickém nálezu však byla patrná mírná psychomotorická retardace s hypotonií a opožděnou vertikalizací. Kardiologické vyšetření prokázalo hraniční tloušťku mezikomorového septa (129 %). Sonografické vyšetření objektivizovalo hepatomegalii (index objemu jater [ILS] 67, norma 32 ± 5) s homogenním parenchymem a mírnou splenomegalii (objem sleziny [SV] 46, norma 30 ± 14) bez nefromegalie.

Nález mírné septální fibrózy a zvětšených hepatocytů s opticky prázdnou cytoplazmou na podkladě mikrovezikulární steatózy v jaterní biopsii posílil podezření na diagnózu glykogenózy, které se ještě zvýraznilo nálezem zvýšených hodnot glykogenu v erytrocytech (193 mg/l, norma ≤ 100). Enzymatická aktivita amylo-α-1,6-glukosidázy v erytrocytech byla snížená na 2,5 % dolní hranice kontrol (pacient 0,3 nmol/24 hod/mg Hb, norma 8–34). Indikovali jsme molekulárně genetické vyšetření, které prokázalo, že chlapec je složený heterozygot pro patogenní mutace c.[565_569delInsGGA]; [753_756delCAGA]; p.[Asn189Glyfs*7]; [Asp251Glufs*23] v genu pro amylo-α-1,6-glukosidázy (*AGL*). Rodiče jsou zdraví přenašeči. Vzhledem k současnému postižení srdce a kosterních svalů se jedná o glykogenózu typu IIIa.

U chlapce byla zavedena frekventní výživa po 3 hodinách s přídavkem maltodextrinu (3,5 g/kg/24 hod). Chlapec toleroval bez rizika hypoglykemie pouze 3hodinový interval mezi jídly přes den a 4hodinový interval v noci. Na frekventní výživě došlo k významnému zlepšení klinického stavu, ale protože přetrvávaly tendence k občasným hypoglykemiím, ponechali jsme ve výživě i přídavky maltodextrinu. V batolecím věku byla postupně zavedena dieta se sníženým obsahem tuků, vysokým obsahem proteinů (až 3,5–4 g/kg/den) a cukrů s nízkým glykemickým indexem. Maltodextrin jsme nahradili nevařeným kukuřičným škrobem.

Chlapci je nyní 6,5 roku, měří 111 cm (6. percentil), váží 23,6 kg (99. proporcionální percentil k výšce) a má obvod hlavy 52 cm (60. percentil). Obličej stále připomíná panenku, má distenzi břiška pro přetrvávající hepatomegalii s nápadně zvětšeným levým lalokem (+7 cm v levé medioklavikulární čáře). Pravý lalok jater přesahuje v medioklavikulární čáře žeberní oblouk o 11 cm (*viz obr. 4.3.5*). Játra jsou v sonografickém vyšetření zvětšená a vysoce echogenní s počínající velkouzlovou přestavbou (ILS 109, norma 40 ± 8), mírně zvětšená je i slezina (SV 136, norma 30 ± 7). V echokardiografickém nálezu je patrná mírná hypertrofická kardiomyopatie se zesíleným interventrikulárním septem (142 % normy). Mentální vývoj chlapce je v normě. V laboratorním nálezu trvá hepatopatie (ALT 14,55 µkat/l, norma < 0,6; AST 17,31 µkat/l, norma < 0,63; GGT 2,29 µkat/l, norma < 0,39), mírná hyperlipidemie (triacylglyceroly 2,29 mmol/l, norma < 1,94; cholesterol 6,85 mmol/l, norma < 4,8) a zvýšená aktivita kreatinkinázy (40 µkat/l, norma < 2,27). Hladiny glukózy i laktátu v krvi jsou v normě.

Obr. 4.3.5 **Významná distenze břiška u 6letého chlapce s glykogenózou typu III a hepatomegalií**

Vysokoproteinovou dietu s omezením tuků chlapec dobře toleruje. Frekvence podávání stravy je stále vysoká – 7× denně včetně dvou nočních porcí s maximální dobou nočního lačnění 5 hodin. Matka do 2 nočních porcí jídla přidává 8 g nevařeného škrobu. Pro snížený příjem mléka chlapec dostává navíc i 250 mg kalcia a 500 IU vitaminu D.

Teoretická část

Etiologie

Glykogenóza typu III (GSD III) je způsobena poruchou funkce tzv. odvětvujícího enzymu, který má duální úlohu v metabolismu glykogenu: amylo-α-1,6-glukosidáza štěpí jeho 1,6 větvící body a oligo-1,4-1,6-glukotransferáza přenáší maltotriózové zbytky na základní řetězec amylózy, kde mohou být postupně dále štěpeny až na volnou glukózu (*viz obr. 4.3.3B*). Enzym se nachází ve všech tkáních, klinické projevy onemocnění se však týkají jen funkce jater, srdce a kosterního svalstva (tento typ GSD se označuje jako GSD IIIa) nebo jenom funkce jater (GSD IIIb). Rozdílný fenotyp GSD IIIa a IIIb je způsoben odlišnou úrovní sestřihu mRNA *AGL*. Dědičnost obou forem onemocnění je autosomálně recesivní, výskyt v populaci je asi 1 : 100 000.

Klinické projevy

Nejčastěji se nemoc projevuje během prvních měsíců života hepatomegalií a atakami ketotických hypoglykemií, hyperlipidemií a hepatopatií. Hypoglykemie se mohou objevit během zvýšeného energetického výdeje (například při horečce) nebo v období delšího lačnění a obvykle nebývají tak závažné jako u pacientů s GSD I, neboť u GSD III zůstává glukoneogeneze a tvorba ketolátek zachována. Hyperlipidemie (hypercholesterolemie i hypertriacylglycerolemie) se objevují až u 40 % pacientů s GSD III, nicméně hladiny tuků dosahují výrazně nižších hodnot než u GSD I. Aktivita kreatinkinázy bývá zvýšená, ale její normální hodnoty diagnózu GSD III nevylučují. Na rozdíl od GSD I není přítomná hyperurikemie ani významnější laktátová acidóza.

Játra jsou v dětství obvykle zvětšená z důvodu akumulace tzv. limitního dextrinu (glykogen s krátkými větvenými úseky). Jaterní buňky jsou v histologickém nálezu výrazně distendované z akumulace vakuol vyplněných glykogenem a tukovými kapénkami (tzv. mikrovezikulární steatóza) a periportální septa bývají fibrotizovaná. Hepatomegalie může být jediným příznakem GSD III, přičemž doprovodná hepatopatie bývá výraznější než u jiných typů glykogenóz. Během dospívání obvykle dochází k ústupu hepatomegalie i hepatopatie a hlavní manifestací GSD III se stává postižení svalů a srdce.

Onemocnění se může komplikovat rozvojem jaterních adenomů, nejčastěji v průběhu dospívání, možná i vlivem snížené *compliance* vůči dietě. Poměrně častý je rozvoj cirhózy, ale progrese adenomů do hepatocelulárního karcinomu (HCC) je vzácná. Sonografická vyšetření ve skupině 43 pacientů s GSD III prokázala výskyt jaterních adenomů u 25 % pacientů, což je méně než u nemocných s GSD I; u nikoho z nich se nerozvinul HCC. V jiné skupině 45 pacientů ve věku od 20 měsíců do 67 let byl HCC potvrzen u dvou pacientů, přičemž u obou byla přítomná cirhóza. Je důležité zmínit, že u pacientů s GSD III a rozvojem HCC nemusejí být sérové markery α-fetoprotein (AFP) ani karcinoembrionální antigen (CEA) zvýšené, a proto nemohou sloužit k predikci rozvoje jaterních adenomů či HCC. Nutné jsou pravidelné sonografické kontroly.

Závažnost postižení srdce je variabilní, od mírných změn po život ohrožující arytmie a těžké srdeční selhání s nutností transplantace srdce. Hypertrofická kardiomyopatie u nemocných s GSD IIIa se může objevit již poměrně časně a v dospělosti může postihovat i více než polovinu pacientů s tímto onemocněním.

Porucha růstu se s nástupem puberty obvykle upravuje, takže dospělí pacienti dosahují normální výšky. Častá je porucha mineralizace kostí. Denzitometrické vyšetření u 12 jedinců s GSD III prokázalo osteopenii u 40 % pacientů, především v oblasti bederní páteře, méně často v oblasti kyčle. Zatímco u nemocných s GSD I je hlavní příčinou poruchy kostní mineralizace metabolická acidóza, renální onemocnění a nedostatečný příjem vápníku, u pacientů s GSD III je nejdůležitějším faktorem inaktivita při myopatii. Osteopenie se však nevyskytuje jen u pacientů s GSD IIIa, ale i u IIIb.

Obdobně jako u postižení srdce je i svalový nález u pacientů s GSD III velmi variabilní, od mírné svalové slabosti až po těžkou poruchu chůze, šplhání při vstávání a neschopnost zvládat i malou fyzickou zátěž. Mezi první příznaky postižení kosterního svalstva u malých dětí s GSD III patří hypotonie a mírné opoždění motorického vývoje, které postihuje až 80 % dětí. Dlouho se předpokládalo, že klinické projevy u pacientů s GSD III vymizí v období kolem puberty, což často vedlo k doporučení ukončit dietoterapii. Stále více studií z posledních let však upozorňuje na častý výskyt dlouhodobých komplikací u dospělých pacientů s GSD III.

Myopatie a polyneuropatie se týkají především onemocnění GSD IIIa, přesto však byly zaznamenány odchylky v neurofyziologických vyšetřeních i u GSD IIIb, které mohou být způsobeny sekundární myopatií na podkladě glukoneogeneze z aminokyselin svalových proteinů nebo – v případě polyneuropatie – akumulací glykogenu ve Schwannových buňkách periferních nervů.

Přestože se udává, že svalová slabost může být v libovolné lokalizaci, většinou bývá postiženo svalstvo proximální. Naopak postižení distálních svalů s atrofií malých svalů ruky je způsobeno kombinací polyneuropatie a méně i myopatie – nejčastější bývá postižení *n. medianus*.

Elektromyografické kondukční studie ukázaly u poloviny nemocných s GSD III snížení rychlosti vedení a prodloužení distálních latencí a 25 % pacientů mělo i snížené amplitudy komplexů, což může svědčit pro určitý podíl ztráty axonů na polyneuropatii. Hladina kreatinkinázy v krvi nekoreluje s klinickými příznaky ani s výsledky neurofyziologických vyšetření, takže nepředstavuje dostatečně citlivý biochemický marker pro riziko progrese svalového postižení.

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření, především u pacientů s hepatomegalií, hepatopatií a atakami ketotických hypoglykemií. Množství glykogenu v erytrocytech bývá zvýšené, ale tento nález není dostatečně specifický. Diagnózu je nutno potvrdit na enzymatické úrovni stanovením aktivity amylo-α-1,6-glukosidázy v erytrocytech a/nebo molekulárně genetickým vyšetřením genu *AGL*.

Léčba

Spočívá ve snaze o udržení normoglykemie v průběhu dne pomocí frekventní výživy doplněné po každém jídle nevařeným kukuřičným škrobem, který vzhledem k nízkému glykemickému indexu přispívá k pomalejšímu uvolňování glukózy. V noci se doporučuje kontinuální výživa pumpou přes gastrostomii, kterou lze u pacientů s mírnější formou onemocnění nahradit dvěma nočními dávkami škrobového preparátu s pauzou nepřesahující 4 hodiny. V kojeneckém věku je vhodnější podávat maltodextrin vzhledem k možným nežádoucím gastrointestinálním účinkům škrobů, od batolecího věku se používají škrobové preparáty.

Dávka maltodextrinu/škrobového preparátu by se měla pohybovat kolem 2–4 g/kg a den, u pacientů bez kontinuální výživy se držíme spíše při horní hranici. Je třeba zdůraznit, že předávkování škrobovými preparáty vede k obezitě a hromadění glykogenu v játrech i dalších orgánech. Důležité je monitorovat glykemie a podávat pokud možno nižší dávky škrobu, ale stále dostatečné pro zachování normoglykemie. Ve výživě se preferují potraviny s nízkým glykemickým indexem, ovšem na rozdíl od pacientů s GSD I není nutno omezovat příjem sacharózy a laktózy a není nutné podávat bezlaktózové mléko do kontinuální noční výživy.

V poslední době se objevují důkazy o účinnosti „vysokoproteinové diety“ s denním příjmem proteinů kolem 3–4 g/kg tělesné hmotnosti. Dieta se zvýšeným obsahem proteinů je účinná především u dětí s myopatií a poruchou růstu. Účinnost vysokoproteinové diety je založena na třech hlavních principech:

1. Pacient s GSD III může při zachované glukoneogenezi využívat alanin z přijímaných proteinů jako náhradní zdroj pro tvorbu glukózy.
2. Vyšší příjem aminokyselin proteinů může zlepšit svalovou funkci na základě zvýšené proteosyntézy.
3. Náhrada sacharidů proteiny ve stravě snižuje tvorbu a hromadění glykogenu.

Zvýšit příjem proteinů ve výživě lze zajistit i pomocí proteinových preparátů. Přísná restrikce tuků ve výživě obvykle u pacientů s GSD III není potřebná, na rozdíl od nemocných s GSD I. Transplantace jater není u pacientů se zachovanou syntetickou funkcí jater indikovaná.

Literatura:

1. Demo E et al.: Glycogen storage disease type III-hepatocellular carcinoma a long-term complication? *J Hepatol* 2007; 46: 492–498.
2. Hobson-Webb LD et al.: The electrodiagnostic characteristics of glycogen storage disease type III. *Genet Med* 2010; 12(7): 440–445.
3. Kishnani PS et al.: Glycogen storage disease type III diagnosis and management guidelines. *Genet Med* 2010; 12(7): 446–463.

5

Poruchy metabolismu lipidů

5.1 Deficit lipoproteinové lipázy

Hana Kolářová, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

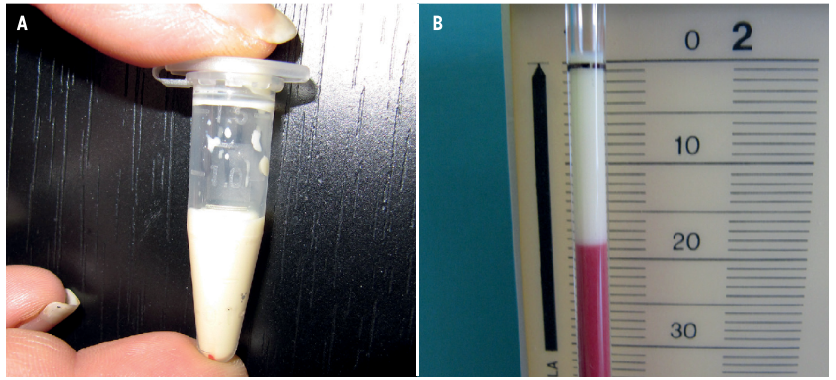
Dívka se narodila z prvního těhotenství v termínu, s porodní hmotností 2700 g a délkou 48 cm. Rodinná anamnéza byla negativní. Již v průběhu prvního týdne života si rodiče všimli zvýšené citlivosti a distenze břišku, neklidu a nápadné plačtivosti, mylně hodnocených jako kojenecké koliky.

Ve věku 2,5 měsíce byla dívka z důvodu progredující distenze břiška (*viz obr. 5.1.1*), nepřetržitého pláče a sníženého příjmu mléka odeslána do nemocnice. Ve fyzikálním nálezu dominovala splenomegalie a ascites. Při odběru krve bylo patrné mléčné zabarvení séra/plazmy (*viz obr 5.1.2*). Laboratorní vyšetření ukázalo extrémní hypercholesterolemii (33,1 mmol/l, norma < 5,2) a hypertriacylglycerolemii (93 mmol/l, norma < 2,2). Hladina HDL cholesterolu byla snížená (0,48 mmol/l, norma 1–1,8), přítomná byla rovněž hepatopatie (ALT 6,6 µkat/l, norma < 0,85; AST 4,3 µkat/l, norma < 0,97) a anemie, která si vyžádala podání erytrocytového koncentrátu (erytrocyty 2,1 × 10^{12}/l, hematokrit 0,18, MCV 85,2 fl, hladina hemoglobinu nemohla být stanovena pro hyperlipidemii). Elektroforéza lipoproteinů prokázala hyperchylomikronemii.

Sonografické vyšetření objektivizovalo splenomegalii (SV 78, kontroly 34,6 ± 5,2), oboustranné mírné zvětšení ledvin (60 mm, kontroly 52,8 ± 6,6) a ascites. Při laparotomické revizi dutiny břišní byly nalezeny zbytky nekrotické tkáně a lipoidní nekrózy omenta v souvislosti se stavem po prodělané akutní pankreatitidě. Vzorek odebrané jaterní tkáně byl steatotický, místy již s počínající fibrózou. Na očním pozadí byly patrné mléčně zabarvené cévy sítnice označované jako *lipaemia retinalis*.

U dívky byla zavedena přísná dieta s omezením tuků do 0,6 g/kg/den. Mateřské mléko a příkrmy byly kombinovány se speciálním mlékem, které obsahuje tuk v koncentraci < 0,1 g/100 ml připraveného mléka a dále s MCT olejem, dlouhými polynenasycenými mastnými kyselinami (LC-PUFA), vitaminy A, E, D a kalciem.

Obr. 5.1.1 **Extrémní distenze břiška u dívky s deficitem lipoproteinové lipázy**



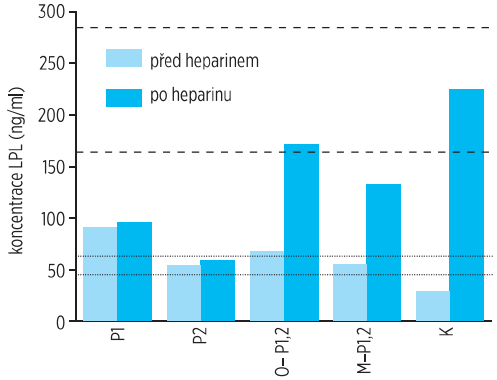
Obr. 5.1.2 **Mléčné zabarvení séra (A). Ukázka vyšetření sedimentace erytrocytů pacienta s deficitem lipoproteinové lipázy (B).**

V současné době je dívka 8letá s hmotností 24 kg (19. percentil), výškou 123 cm (45. percentil) a obvodem hlavy 52 cm (65. percentil). Hepatopatie, splenomegalie, nefromegalie a *lipaemia retinalis* vymizely. Neprodělala další ataku akutní pankreatitidy a nedošlo k rozvoji eruptivních xantomů. Je trvale na nízkotukové dietě (≤ 0,6 g tuků/kg a den); hladina triacylglycerolů se drží pod 10 mmol/l a hladina cholesterolu pod 6 mmol/l.

Mladší bratr se narodil o 3 roky později po nekomplikované graviditě, s porodní hmotností 3390 g (30. percentil) a délkou 51 cm (55. percentil). Vzhledem k pozitivní

rodinné anamnéze byl odběr lipidogramu proveden již 5. den života s nálezem významné hypertriacylglycerolemie (126 mmol/l) a hypercholesterolemie (17,6 mmol/l). Sonografické vyšetření prokázalo zvýšenou echogenitu parenchymu sleziny a jater a lehce zvětšené ledviny (47 mm, kontroly 44,8 ± 0,3). Rychlé zavedení diety zabránilo rozvoji dalších komplikací. Nyní je chlapci 5 let, váží 16 kg (3,8. percentil) a měří 112 cm (55. percentil), obvod hlavy činí 51 cm (55. percentil). Toleruje 0,6 g přirozených tuků ve stravě na kg a den.

U obou sourozenců jsme vyslovili podezření na deficit lipoproteinové lipázy (LPL). Koncentrace imunoreaktivní LPL (metodou ELISA) byla stanovena v séru před (tzv. preheparinová hladina) a 15 minut po intravenózním podání heparinu v dávce 30 IU/kg tělesné hmotnosti (tzv. postheparinová hladina). Nález pouze minimálního uvolnění LPL po nitrožilním podání heparinu byl pozitivní pro deficit LPL *(viz obr. 5.1.3)*. Molekulárně genetická analýza odhalila u obou sourozenců novou mutaci c.476C>G; p.Ser159Thr v genu *LPL* v homozygotním stavu. Rodiče jsou zdraví přenašeči.



Obr. 5.1.3 Koncentrace lipoproteinové lipázy před podáním heparinu a po něm u dvou sourozenců s deficitem LPL a jejich rodičů.

Pozn.: Dva pacienti s deficitem LPL (P1, P2), jejich rodiče (O – P1, 2: otec P1 a P2; M – P1, 2: matka P1 a P2) a zdravá kontrola (K).

Teoretická část

Etiologie

Deficit lipoproteinové lipázy (LPL) je vzácné autosomálně recesivně dědičné onemocnění s manifestací nejčastěji v časném dětství. Prevalence této nemoci se odhaduje na 1 : 1 000 000 dětí. LPL je enzym zodpovědný za štěpení triacylglycerolů v sérových chylomikronech a lipoproteinech s velmi nízkou hustotou (VLDL). Aktivní je pouze LPL, která je vázaná na endotel kapilár prostřednictvím heparansulfátu.

Klinické projevy

Zahrnují rekurentní bolesti břicha, hepatosplenomegalii, akutní pankreatitidu, *lipaemia retinalis* a eruptivní xantomy. V laboratorním nálezu bývá extrémní hypertriacylglycerolemie (> 11,3 mmol/l) způsobující typické mléčné zabarvení séra, dále hypercholesterolemie (> 5,2 mmol/l) a nízká hladina HDL cholesterolu (< 0,5 mmol/l). Poměrně častým nálezem je normocytární anemie, která se vysvětluje nejen okultními ztrátami krve do zažívacího traktu, ale i kratším přežíváním erytrocytů při mírné hemolýze dané změnou lipidového složení erytrocytové membrány. Klinické příznaky a laboratorní nálezy našich dvou dětí v porovnání se skupinou 45 zahraničních pacientů jsou shrnuty v *tab. 5.1.1*.

Tab. 5.1.1 Klinická a laboratorní data 2 pacientů s deficitem LPL ve srovnání s literaturou

	Kolářová et al.[4]		Feoli-Fonseca et al.[3]	Pouwels et al.[5]
	pacient 1	pacient 2	n = 16	n = 29
Onemocnění sourozence	+	+	1/16	8/29
Pohlaví (Ž/M)	Ž	M	Ž10/16	n. a.
Věk manifestace	1 T	*)	< 1 R	2–43 R
Současný věk (roky)	8	5	n. a.	n. a.
Klinická data				
Neklid	+	–	7/16	n. a.
Abdominální dyskomfort	+	–	2/16	n. a.
Zvracení	–	–	3/16	n. a.
Průjem	–	–	1/16	n. a.
Akutní pankreatitida	+	–	7/16	16/29
Hepatomegalie	–	–	7/16	n. a.
Splenomegalie	+	–	7/16	n. a.
Eruptivní xantomy	–	–	3/16	2/29
Lipaemia retinalis	+	–	5/16	n. a.
Krvácení do trávicího systému	–	–	2/16	n. a.
Laboratorní data				
Triacylglyceroly (mmol/l)	93	126	↑ 16/16	↑ 29/29
Celkový cholesterol (mmol/l)	33,1	17,6	4,26–32,17	n. a.
HDL cholesterol (mmol/l)	0,48	0,47[*)]	n. a.	n. a.
Hepatopatie	+	–	n. a.	n. a.
Hemoglobin < 95 g/l	+	–	10/16	n. a.
Aktivita LPL (ng/ml)[£]	4,6	5,6	n. a	n. a.

Pozn.: n. a. = data nebyla k dispozici; **T** = týden; **R** = rok; **Ž** = žena; **M** = muž.

*) Mladší bratr pacienta 1 byl v době stanovení diagnózy (5 dní věku) asymptomatický.

*) Na dietě.

£) Aktivita LPL je vyjádřena jako rozdíl mezi pre- a postheparinovou koncentrací LPL (kontroly 119–220 ng/ml).

Diagnostika

Je založena na stanovení postheparinové koncentrace LPL a na molekulárně genetické analýze genu *LPL*.

Léčba

Uplatňuje se přísná nízkotuková dieta se suplementací esenciálních polynenasycených mastných kyselin, vitaminů rozpustných v tucích a vápníku. Doplňkem mohou být rovněž MCT oleje (C8–C12), které nezvyšují zásadně hladinu triacylglycerolů. Hypolipidemika nemají v terapii deficitu LPL uplatnění. I když je od konce roku 2012 k dispozici genová terapie (preparát alipogene tiparvovec), její extrémně vysoká cena zabraňuje většímu rozšíření do praxe. Při včasné diagnóze je prognóza onemocnění dobrá, prenatální diagnostika tak musí být zvažována pouze v individuálních případech.

Literatura:

1. Brunzell JD, Bierman EL: Chylomicronemia syndrome. Interaction of genetic and acquired hypertriglyceridemia. *Med Clin North Am* 1982; 66: 455–468.
2. Evans V, Kastelein JJ: Lipoprotein lipase deficiency – rare or common? *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16: 283–287.
3. Feoli-Fonseca JC et al.: Familial lipoprotein lipase deficiency in infancy: clinical, biochemical, and molecular study. *J Pediatr* 1998; 133: 417–423.
4. Kolářová H et al.: Lipoprotein lipase deficiency: clinical, biochemical and molecular characteristics in three patients with novel mutations in the LPL gene. *Folia Biol (Praha)* 2014; 60(5): 235–243.
5. Pouwels ED et al.: Severe hypertriglyceridaemia as a result of familial chylomicronaemia: the Cape Town experience. *S Afr Med J* 2008; 2: 105–108.
6. Rahalkar AR et al.: Novel LPL mutations associated with lipoprotein lipase deficiency: two case reports and a literature review. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87: 151–160.

5.2 Poruchy β-oxidace mastných kyselin

Pavel Ješina, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

5.2.1 Porucha β-oxidace mastných kyselin na úrovni dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD)

Kazuistika

Chlapec se narodil z první fyziologické gravidity (před rokem 2009, tedy ještě v době před zavedením novorozeneckého screeningu poruch β-oxidace). Porod proběhl v termínu, porodní hmotnost činila 3400 g a délka 50 cm. Nebyl křišen a skóre dle Apgarové dosahovalo 9-10-10. Všechna očkování v kojeneckém věku proběhla bez komplikací a psychomotorický vývoj odpovídal věku.

V 15 měsících věku, kdy měřil 84 cm (85. percentil), vážil 10 kg (3. hmotnostně-délkový percentil) a měl obvod hlavy 47 cm (35. percentil), se po nočním hladovění a ranním nechutenství s celkovou dobou lačnění 15–16 hodin objevila ataka bezvědomí s rozvojem klonických záškubů a stáčením do opistotonu. Při přijetí na oddělení byla zjištěna hypoglykemie (1,1 mmol/l, norma > 3,5 mmol/l), mírná hepatopatie (ALT 1,05 µkat/l a AST 1,25 µkat/l, norma < 0,63), elevace kreatinkinázy (36,9 µkat/l, norma ≤ 2,3), metabolická acidóza s BE -6,6 mmol/l (norma 0 ± 2) a hypoketonurie. Chlapec dostal intravenózní bolus glukózy a antikonvulziva. Glykemie se upravila, křeče odezněly, ale trvala porucha vědomí. Vyšetření očního pozadí i CT mozku byly v normě a nález v mozkomíšním moku nesvědčil pro neuroinfekci. Vyšetření EEG zaznamenalo abnormní záznam s větší příměsí pomalých vln bez specifických epigrafoelementů.

Diagnózu u chlapce odhalilo metabolické vyšetření, které svědčilo pro poruchu mitochondriální β-oxidace mastných kyselin na úrovni dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD). Vyšetření metodou tandemové hmotnostní spektrometrie v suché krevní kapce ukázalo zvýšenou koncentraci oktanoyl-karnitinu (C8) a zvýšené poměry v profilu acyl-karnitinů C8/C10, C8/C12 a C8/C2. V moči byly nalezeny vysoké koncentrace kyselin adipové (945 mg/g kreatininu, norma ≤ 50), suberové (401 mg/g kreatininu, norma ≤ 15) a sebakové (76 mg/g kreatininu, norma ≤ 40) a glycinových konjugátů, zejména hexanoyl-glycinu a suberyl-glycinu, které u zdravých osob nejsou detekovatelné. Hladina volného karnitinu v krvi byla výrazně snížená (2,4 µmol/l, norma > 24,3). Diagnóza MCAD byla potvrzena i na molekulárně genetické úrovni, chlapec je nositelem prevalentní patogenní mutace c.985A>G v genu *ACADM* v homozygotní konstituci, která vede k aminokyselinové záměně lysinu za glutamát na 329. pozici (p.Lys329Glu).

V terapii jsme pokračovali s intenzivní intravenózní aplikací glukózy (8 mg/kg/min), na které se pozvolna zlepšoval chlapcův stav vědomí, ale přetrvával centrální hypotonický syndrom a objevily se i mozečkové příznaky s paleocerebelární a méně i neocerebelární symptomatologií. Chlapec byl postupně převeden z intravenózní terapie na pravidelnou frekventní perorální výživu s přídavky maltodextrinu každé 3 hodiny přes den a v noci dostával 1–2 menší porce jídla s přídavkem nevařeného kukuřičného škrobu, aby interval mezi nočními jídly nebyl delší než 5 hodin.

Ačkoli po propuštění z nemocnice byl u chlapce vidět určitý regres psychomotorického vývoje na úroveň 7.–8. měsíce, jeho klinický stav se postupně zcela upravil. Další komplikace se objevily až ve věku 2,5 roku, kdy prodělal čtyři ataky zahlednění se stáčením očí vzhůru a promodráním v obličeji v trvání do 30 vteřin. Laboratorní vyšetření již neprokázala hypoglykemii, hepatopatii ani odchylky v acidobazické rovnováze. Neurologické i kardiologické vyšetření bylo v normě, ale pro abnormální záznam na EEG a anamnestické údaje o křečích v 15 měsících věku byla doporučena antiepileptická terapie (levetiracetam), díky které se již záchvaty neopakovaly.

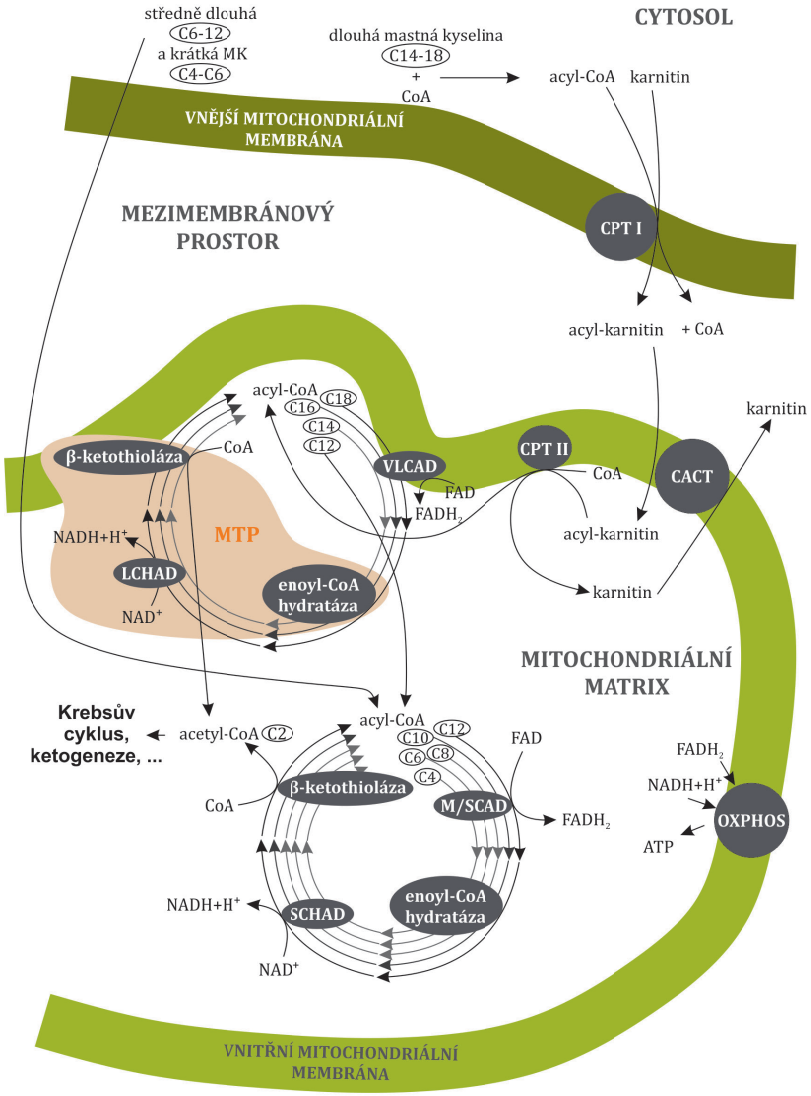
Chlapci je nyní 9 let, prospívá, jeho hmotnost činí 27,2 kg (25. percentil), výška 129,5 cm (12. percentil) a obvod hlavy 51,8 cm (22. percentil). Neurologický nález je v pořádku a psychomotorický vývoj odpovídá věku.

Teoretická část

Etiologie

Porucha na úrovni dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD – *medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase*) je onemocnění způsobené poruchou jednoho z klíčových enzymů β-oxidace mastných kyselin *(viz obr. 5.2.1)*. Dědičnost MCAD je autosomálně recesivní a její výskyt se v jednotlivých populacích významně liší. Nejnižší je v Asii (Tchaj-wan 1 : 263 000, Japonsko 1 : 51 000), vyšší v Severní Americe (Kanada 1 : 23 400, USA 1 : 13 000–19 000) a nejčastější v Evropě (Dánsko 1 : 9000, Velká Británie 1 : 10 700, severní Německo 1 : 4900). V Česku výskyt dosahuje cca 1 : 20 700.

β-oxidace mastných kyselin probíhá v mitochondriální *matrix* a představuje základní metabolickou dráhu, která v období hladovění poskytuje až 80 % energie. β-oxidace úzce souvisí s Krebsovým cyklem a dýchacím řetězcem a probíhá pouze za aerobních podmínek. Vstup mastných kyselin (MK) přes zevní a vnitřní mitochondriální membránu do *matrix* probíhá v závislosti na délce jejich uhlíkového řetězce. MK s krátkým či středně dlouhým řetězcem (< C12) volně přestupují obě mitochondriální membrány,



Obr. 5.2.1 Zjednodušené schéma β-oxidace mastných kyselin v *matrix* mitochondrie

Pozn.: CoA = koenzym A; **CACT** = karnitinacylkarnitintranslokáza; **CPT I a II** = karnitinpalmitoyltransferáza; **MCAD** = acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem; **MTP** = mitochondriální trifunkční protein; **LCHAD** = 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem; **SCAD** = acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s krátkým řetězcem; **VLCAD** = acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem.

ale MK s dlouhým řetězcem C14–C22 jsou transportovány do mitochondrie jen pomocí specifických transportních proteinů (*viz obr. 5.2.1*). Vnější mitochondriální membránu přecházejí ve vazbě na acyl-koenzymA (acyl-CoA) a přes vnitřní membránu jsou transportovány v podobě acyl-karnitinů. Z MK s dlouhým řetězcem jsou ve stravě zastoupeny zejména MK se sudým počtem uhlíků (C14, C16 a C18). MK s velmi dlouhým řetězcem (C24–C26) a MK s lichým počtem uhlíků do mitochondrie neprocházejí, dokud jejich velmi dlouhé řetězce nejsou zkráceny v peroxisomu.

Přenos MK mezi CoA a karnitinem katalyzuje karnitinpalmitoyltransferáza I (CPT I) na cytosolové straně vnější mitochondriální membrány. Karnitinacylkarnitintranslokáza (CACT) ve vnitřní mitochondriální membráně umožňuje výměnu karnitinu za acyl-karnitin, čímž se acyl-karnitin dostává do *matrix* mitochondrie. Zde dojde ke zpětnému přenosu MK z acyl-karnitinu na CoA prostřednictvím karnitinpalmitoyltransferázy II (CPT II). Uvolněný karnitin opouští *matrix* pomocí translokázy výměnou za nový acyl-karnitin. Tímto způsobem se dostává acyl-CoA do *matrix* mitochondrie, kde běží vlastní β-oxidace MK.

Jednotlivé reakce β-oxidace katalyzují čtyři typy enzymů: acyl-CoA dehydrogenáza, enoyl-CoA hydratáza, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenáza a β-ketothioláza. β-oxidaci MK tak můžeme popsat jako sled reakcí: dehydrogenace, hydratace, dehydrogenace a thiolytického štěpení. Podle délky uhlíkového řetězce acyl-CoA, který je metabolizován v prvním kroku, tedy dehydrogenaci, rozlišujeme dvě dehydrogenázy pro MK s dlouhým řetězcem a počtem uhlíků C14–C22 (VLCAD = dehydrogenáza dlouhých acyl-CoA; LCHAD = dehydrogenáza dlouhých 3-hydroxyacyl-CoA), dehydrogenázu středně dlouhých acyl-CoA (MCAD; C6–C12) a dehydrogenázu pro MK s krátkým řetězcem (SCAD; C4–C6).

β-oxidace je cyklický proces. Při jednom cyklu se MK zkrátí o 2 uhlíky, vstupuje do dalšího kola a nakonec vznikne acetyl-CoA a redukované koenzymy $NADH+H^+$ a $FADH_2$, které jsou využívány oxidativní fosforylací k tvorbě energie. Acetyl-CoA je využit v Krebsově cyklu a tvorbě ketolátek, které jsou cenným energetickým zdrojem zejména pro mozek a srdce. Ketolátky jsou v tkáních využívány v okamžiku, kdy jsou po delším hladovění vyčerpány zásoby glykogenu. Pro představu o celkové výtěžnosti β-oxidace při tvorbě energie lze jako příklad uvést kyselinu palmitovou (MK s řetězcem o 16 uhlících): palmitoyl-CoA + 7 FAD + 7 NAD^+ + 7 HSCoA + 7 H_2O → 8 acetyl-CoA + 7 $FADH_2$ + 7 $NADH+H^+$. Celkový zisk činí 129 molekul ATP.

Pacienti s poruchou β-oxidace MK na úrovni dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD) jsou ohroženi atakami hypoglykemií, především po delším hladovění po vyčerpání zásob jaterního glykogenu. Během akutní dekompenzace jsou jen ve zmenšené míře produkovány ketolátky, proto jsou u poruchy MCAD přítomné hypoglykemie neketotické či hypoketotické.

Na myších modelech byl prokázán dopad poruchy MCAD na expresi transkripčních faktorů (PPARα – *peroxisome proliferator-activated receptor alpha*; PGC-1α – *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha*; PDK4 – *pyruvate dehydrogenase kinase 4*), které regulují jaterní metabolismus MK a glukózy. Hromadění metabolitů odvozených od MK se středně dlouhým řetězcem nad enzymatickým blokem negativně ovlivňuje mitochondriální funkce v mozku, játrech a kosterním svalstvu. Metabolity kyseliny kaprylové (oktanové; C8), kaprinové (dekanové; C10) a 4-*cis*-decenové (nenasycená kyselina dekanová; C10) snižují aktivitu respiračního řetězce a rozpojují systém oxidativní fosforylace. Zvyšuje se oxidativní stres, je porušena intracelulární homeostáza vápníku, zvyšuje se propustnost mitochondriální membrány otevřením PTP (*permeability transition poor*) a rozvíjí se apoptóza.

Klinické projevy

U nediagnostikovaných a neléčených pacientů se mohou objevit ve kterémkoli věku, nejčastěji mezi 3. a 24. měsícem (*viz tab. 5.2.1*). Obvykle se jedná o hypoglykemické stavy v souvislosti s prodloužením intervalu mezi jídly nebo vynecháním noční porce pití u kojenců a batolat, eventuálně po delším lačnění při akutním horečnatém infektu se zvracením či průjmem. Hypoglykemie začínají změnami chování, tachykardií, pocením, třesem, rychle progreduje porucha vědomí a rozvíjejí se hypoglykemické křeče.

V závislosti na četnosti metabolických dekompenzací může dojít k opoždění psychomotorického vývoje a/nebo rozvoji sekundární epilepsie. V neurologickém nálezu je někdy popisována svalová hypotonie a zejména u pozdních forem onemocnění byly popsány i ataky rhabdomyolýz. Odhaduje se, že MCAD byl před zavedením novorozeneckého screeningu příčinou smrti u 3 % dětí se syndromem náhlého úmrtí (SIDS). Dnes dochází k metabolické dekompenzaci jen u pacientů, kteří nejsou při nechutenství, zvracení či průjmech včas zajištěni infuzí s glukózou (*viz tab. 5.2.2*).

Tab. 5.2.1 Klinické a laboratorní příznaky u 50 pacientů s poruchou dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD) sledovaných v naší ambulanci od roku 1994.
Od 1. 10. 2009 bylo diagnostikováno 29 novorozenců v rámci rozšířeného novorozeneckého laboratorního screeningu dědičných metabolických poruch.

Klinické a laboratorní příznaky	Diagnóza stanovená před zavedením novorozeneckého screeningu	Diagnóza v rámci novoroz. screeningu
Počet pacientů (n)	21	29
Porucha vědomí při hypoglykemii	7/21	–/29
Reye-like epizoda	9/21	1/29
Hepatopatie	5/21	6/29
Hypotonie	2/21	2/29
Psychomotorická retardace (IQ < 80)	7/21	1/29

Tab. 5.2.2 Aktuální potřeba glukózy při infuzní léčbě pacientů s poruchou dehydrogenázy středně dlouhých acyl-CoA (MCAD) při operacích v narkóze nebo při riziku rozvoje katabolismu v období horečky, zvracení či průjmu

Věk	< 1 rok	1–3 roky	4–6 let	7–12 let	13–18 let	dospělí
Potřeba glukózy*) (mg/kg/min)	8–10	7–8	6–7	5–6	4–5	3–4

Pozn.: *) Hladiny glukózy je třeba pravidelně monitorovat.

Výsledky laboratorních vyšetření mezi atakami bývají v normě. Při atace nacházíme hypoketotickou hypoglykemii často doprovázenou metabolickou acidózou se zvýšeným anion gapem, někdy s laktátovou acidózou. V krvi mohou být zvýšené hladiny aminotransferáz a kyseliny močové kvůli kompetici kyseliny močové s laktátem o přenašeč v tubulárních buňkách ledvin. Přítomná může být i hyperamonemie (nejspíše v rámci snížené tvorby N-acetyl-L-glutamátu, která je však mírnější než u pacientů s poruchou LCHAD – *viz kap. 5.2.2*). Sonografické vyšetření může zobrazit hepatomegalii s obrazem steatotických změn v jaterním parenchymu. Steatóza je malokapénková, s akumulací v cytoplazmě.

Diagnostika

Od roku 2009 je deficit MCAD součástí novorozeneckého laboratorního screeningu, který je prováděn pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) vyšetřením profilu karnitinů/acyl-karnitinů v suché krevní kapce odebrané novorozenci třetí den života. Typický je nález zvýšené koncentrace oktanoyl-karnitinu (C8), někdy i karnitinů C6 a C10, se zvýšeným poměrem mezi karnitiny C8 a C2. V krvi je snížená hladina volného karnitinu a v moči je zvýšené vylučování dikarboxylových kyselin (adipové, suberové a sebakové) a acyl-glycinů (hexanoylglycin, fenylpropionylglycin a/nebo suberylglycin), jež nejsou přítomné u zdravých osob.

Diagnózu je nutno potvrdit na molekulární úrovni analýzou genu *ACADM*. V naší populaci je nejčastější mutace c.985A>G; p.Lys329Glu, která se vyskytuje cca u 75 % pacientů.

Léčba

Je vedena snahou předejít prostřednictvím antihypoglykemického režimu rozvoji metabolických dekompenzací. Je založena na frekventní výživě. U novorozenců a kojenců do 6 měsíců věku by interval mezi jídly neměl být delší než 3 hodiny, u starších kojenců 4 hodiny, u batolat 5 hodin, u předškolních dětí 6 hodin, u školních dětí 7 hodin a u mladistvých a dospělých 8 hodin.

Není nutné volit nízkotukovou dietu, ale je nezbytné se vyvarovat podávání přípravků obsahující mastné kyseliny o středně dlouhém řetězci. Většina pracovišť nedoporučuje podávání L-karnitinu, a to ani při jeho středně snížené hladině. Ke slazení by se u kojenců měly používat pouze maltodextriny a od batolecího věku škroby (např. nevařený kukuřičný). Neměl by se používat řepný a třtinový ani hroznový cukr, protože vedou k rychlému vzestupu glykemie, na kterou pak reagují β-buňky pankreatu vyplavováním inzulinu.

Při sportu či fyzické námaze je nutné zvýšit energetické zdroje formou tekutin s maltodextriny (připravován je 10–25% roztok dle věku pacienta). V případě, že pacient netoleruje jídlo ani sladké tekutiny, se přistupuje k preventivnímu podávání infuzí s glukózou a ionty. Dávky glukózy jsou závislé na věku (*viz tab. 5.2.2*), nutné je i monitorování glykemií. Při rozvoji *Reye-like* syndromu či rhabdomyolýze nestačí preventivní dávky glukózy (*viz tab. 5.2.4*). Vysoké dávky glukózy mohou být v indikovaných případech kombinovány i s podáváním inzulinu pro jeho anabolický efekt.

Literatura:

1. Matern D, Rinaldo P: Medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *GeneReviews, University of Washington*, Seattle, 1993–2016.
2. Rinaldo P, Matern D, Bennett MJ: Fatty acid oxidation disorders. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 477–502.
3. Spiekerkoetter U, Wood PA: Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33(5): 539–546.
4. Spiekerkoetter U, Duran M: Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. In: Thöny B et al. (eds.): Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases. *Springer*, 2014: 247–264.
5. Wajner M, Amaral AU: Mitochondrial dysfunction in fatty acid oxidation disorders: insights from human and animal studies. *Biosci Rep* 2015; 36(1): e00281.

transkripční faktory, např. NRF1 a 2 (nukleární respirační faktory) a další. Předpokládá se, že tato signální dráha je u primárních mitochondriálních onemocnění narušena.

Klinické projevy

Mohou se objevit ve kterémkoli věku. Jen vzácně se onemocnění projeví již v prvních měsících života, asi u poloviny případů do 16 let (juvenilní forma), u druhé poloviny až později (adultní forma). Zásadní vliv na rozvoj a tíži příznaků má hladina heteroplazmie mutované mtDNA. Heteroplazmie vyjadřuje podíl mutovaných kopií mtDNA na celkovém počtu molekul mtDNA ve vyšetřované tkáni. Onemocnění se obvykle projevuje při hodnotách heteroplazmie > 70 %.

Spektrum příznaků je velice široké a mohou se různě kombinovat. Častá je porucha sluchu, ptóza víček, chronická progresivní externí oftalmoplegie (CPEO), svalová slabost, intolerance fyzické zátěže, bolest svalů po námaze, kardiomyopatie, mozečková symptomatologie, opakované migrény, iktu podobné příhody, epilepsie a *diabetes mellitus* 1. či 2. typu. U dětí bývá přítomno neprospívání, porucha růstu a porucha psychomotorického vývoje.

Svalová únava a myalgie po námaze byly v našem souboru pacientů prvním příznakem onemocnění skoro v jedné pětině případů. Častá je progredující myopatie, u části nemocných v kombinaci s projevy polyneuropatie, se ztuhlostí, brněním a bolestivostí končetin. Ataky iktu podobných příhod jsou přítomny až u poloviny pacientů s rozvinutým onemocněním, často jim předcházejí rekurentní bolesti hlavy imitující migrénu (až v 70 % případů). V době ataky jsou časté křeče, poruchy zrakového pole, hemianopsie, hemiplegie a afázie. Obtíže obvykle trvávají hodiny, ale i dny až týdny a ne vždy dojde po odeznění ataky k úpravě původního stavu.

Iktu podobné příhody jsou časté již v průběhu dospívání nebo až v průběhu třetího decenia (v našem souboru průměr činil 25 ± 11 let). Kognitivní deficit je u pacientů se syndromem MELAS relativně častý, většinou v pásmu mírné mentální retardace.

Mezi nejčastější projevy onemocnění patří senzorineurální porucha sluchu, jejíž časná diagnostika a adekvátní terapie (naslouchadla, kochleární implantát) může zamezit poruše vývoje řeči. Častá je ptóza a CPEO. Ta je charakterizována zvolna probíhající progresivní paralýzou zevních očních svalů, která se projevuje poruchou pohledu vzhůru nebo do stran. Očními symptomy onemocnění začíná ve 25 % případů. Pigmentová retinopatie a atrofie papily optického nervu mohou vést ke snížení zrakové ostrosti až úplné ztrátě zraku. U řady pacientů dochází k rozvoji systolické dysfunkce nebo k dilatační kardiomyopatii s terminálním srdečním selháním. Kardiomyopatie u pacientů se syndromem MELAS se může asociovat i s nestrukturálním postižením, jako je Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom. Mezi další příznaky patří porucha motility trávicího traktu a endokrinní poruchy (hypotyreóza, *diabetes mellitus*).

V ČR bylo dosud diagnostikováno > 50 jedinců s mtDNA mutací m.3243A>G v genu *MTTL1*. Z nich 64 % již má různé obtíže a plně vyjádřené projevy onemocnění má 42 %. První příznaky u pacientů s plně vyjádřeným syndromem MELAS se manifestovaly průměrně v 11 letech, zatímco u pacientů s oligosymptomatickou formou bez iktu podobných příhod až ve 22 letech. Medián časového intervalu mezi nástupem prvního a dalšího příznaku je v průměru 5 let a mezi druhým a třetím příznakem 2 roky. Klinické projevy našeho souboru pacientů v porovnání s literárními údaji jsou shrnuty v *tab. 6.1.1*.

Diagnostika

Více než polovina pacientů má mírně zvýšenou hladinu laktátu v krvi a/nebo moči. Hladina laktátu významně stoupá při akutních dekompenzacích. Aktivita kreatinkinázy nebývá významně zvýšená. Při CT/MRI vyšetření mozku bývají přítomné fokální léze po proběhlých iktu podobných příhodách, častá je mozečková či mozková atrofie.

Tab. 6.1.1 Klinické projevy 33 českých pacientů se syndromem MELAS ve srovnání se zahraničními studiemi *(upraveno dle: Dvořáková et al., 2014 a 2016)*

Klinický symptom	Česká studie[3, 4)]	Italská studie (Mancuso et al.)[5)]	Nizozemská studie (de Laat et al.)[2)]	Australská studie (Chin et al.)[1)]
Počet pacientů (n)	33	126	71	35
	%	%	%	%
Sluch				
Percepční nedoslýchavost	75	58	68	63
Zrak				
Ptóza/CPEO	44	28	45	14
Retinopatie	13	10	–	17
Atrofie *n. opticus*	6	5	–	9
Postižení svalů				
Svalová slabost	9	40	48	31
Intolerance fyzické zátěže	50	33	54	23
Svalová bolest	6	10	–	–
Interní onemocnění				
Kardiomyopatie	31	32	44	9
Diabetes	44	41	52	51
Hypotyreóza	9	4	–	6
Dysmotilita GIT	50	13	60	17
Neurologické projevy				
Epilepsie	41	37	13	20
Migrény	28	28	25	29
***Stroke-like* epizody**	41	41	6	20
Polyneuropatie	34	10	20	11
Ataxie	9	20	50	9
Myoklonus	3	6	–	6
Jiné				
Neprospívání/nízký vzrůst	38	17	–	23
Snížení kognitivních schopností	38	25	45	11
Psychiatrické postižení	19	6	28	6

Pozn.: CPEO = chronická progresivní externí oftalmoplegie.

Někteří pacienti mívají kalcifikace v bazálních gangliích. Lokalizace lézí po iktu podobných příhodách nemusí na rozdíl od klasických iktů odpovídat cévnímu zásobení.

Histochemické vyšetření svalové biopsie prokáže většinou jen nespecifické změny, pouze část pacientů má fokální subsarkolemickou akumulaci SDH (sukcinátdehydrogenáza) produktu až do obrazu rozeklaných svalových vláken (RRF – *ragged red fibres*). Spektrofotometrická a elektroforetická vyšetření v izolovaných svalových mitochondriích sice mohou ukázat snížení aktivity a množství komplexů dýchacího řetězce I, III nebo IV, ale negativní výsledky mitochondriální etiologii onemocnění nevylučují.

Diagnózu je nutno potvrdit na molekulárně genetické úrovni. Vhodný biologický materiál pro diagnostiku představují kromě svalové biopsie i buňky bukálního stěru nebo močového sedimentu. Vyšetření lze provést rovněž ve vlasových kořínčích. Pacienti s plně vyjádřeným onemocněním mívají vyšší hladinu heteroplazmie.

Léčba

V chronické léčbě u všech pacientů s klinicky vyjádřeným syndromem MELAS je doporučeno perorální podávání L-citrulinu a L-argininu ve snaze zvýšit hladinu argininu v krvi nad 100 µmol/l a tím i zvýšit koncentraci oxidu dusnatého v mozku. Uvedená léčba pomáhá prodloužit intervaly mezi iktu podobnými příhodami. V době akutní fáze *stroke-like* epizody se doporučuje podávat argininchlorid v kontinuální infuzi po dobu 48–72 hodin. U některých pacientů pomáhá podpůrná léčba antioxidanty – koenzymem Q_{10} a vitaminy C a E.

U pacientů s migrenózní cefaleou hrozí vyšší riziko rozvoje *stroke-like* epizody, proto je vhodné tyto nemocné pečlivě monitorovat. Migrénu a epilepsii lze léčit standardními postupy, kyselině valproové je však vhodné se vyhnout. U pacientů, u nichž se rozvinul *diabetes mellitus* 1. či 2. typu, je nutná adekvátní diabetologická terapie. Senzorineurální porucha sluchu je u nemocných řešena pomocí naslouchadel, v případě úplné ztráty sluchu kochleárním implantátem.

Hudbou budoucnosti je snaha nalézt selektivní aktivátory signální dráhy pro AMPK, zkouší se například AICAr (5-aminoimidazol-4-karboxamid-1-β-D-ribofuranosid). Výzkum se zaměřuje i na hledání vhodnějších analogů koenzymu Q_{10}, které by také měly ovlivnit signální dráhu pro AMPK.

Práce byla podpořena MZ ČR AZV 16-32341A.

Literatura:

1. Chin J et al.: Detection rates and phenotypic spectrum of m.3243A>G in the MT-TL1 gene: a molecular diagnostic laboratory perspective. *Mitochondrion* 2014; 17: 34–41.
2. de Laat P et al.: Clinical features and heteroplasmy in blood, urine and saliva in 34 Dutch families carrying the m.3243A > G mutation. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35: 1059–1069.
3. Dvořáková V a kol.: MELAS syndrom. In: Ehler E a kol.: Vzácná onemocnění. *Solen*, Praha, 2014: 44–56.
4. Dvořáková V et al.: The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers. *Mol Genet Metab* 2016 Aug; 118(4): 288–295
5. Mancuso M et al.: The m.3243A>G mitochondrial DNA mutation and related phenotypes. A matter of gender? *J Neurol* 2014; 261: 504–510.

6.2 Leberova hereditární neuropatie optiku

Hana Kolářová, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Pacient byl až do třetí dekády života zcela v pořádku. Jeho již zemřelý prastrýc měl těžkou poruchu zraku, jež byla přičítána diabetické retinopatii; zbytek rodiny nemá zrakové obtíže. Pracoval jako elektromontér a ve volném čase se věnoval bojovým sportům. Nikdy nekouřil, alkohol pil jen příležitostně. V rámci preventivního vyšetření u očního lékaře ve věku 19 let byla zraková ostrost v normě (bilaterálně 6/6, tedy 1,0); brýle nikdy nenosil.

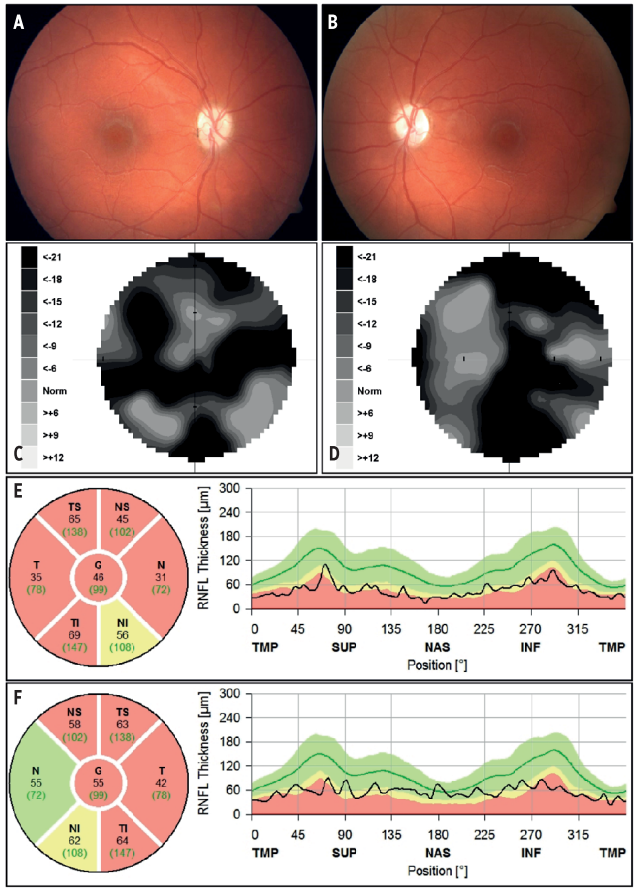
Ve věku 27 let však došlo během několika týdnů k nebolestivé ztrátě zrakové ostrosti. Udával defekt zorného pole v centru, který se postupně rozšiřoval směrem do periferie. Vyšetření na spádové oční klinice 3 měsíce od prvních projevů prokázalo zhoršení vizu na 0,2 (oko pravé [OP]) a 0,03 (oko levé [OL]). Kvůli diagnostickým rozpakům bylo doplněno vyšetření mozku pomocí magnetické rezonance, kde dominoval nález retrobulbární hyperintenzity v oblasti optických nervů při negativním likvorologickém nálezu. Vzhledem k rychlé progresi nemoci a diagnostickým rozpakům bylo vysloveno podezření na *neuromyelitis optica* při *sclerosis multiplex* a zahájena terapie pomocí kortikosteroidů.

Stav se bohužel horšil a vyšetření očí 8 měsíců od počátku prvních obtíží prokázalo snížení zrakové ostrosti na úroveň praktické slepoty (bilaterálně 0,02) na podkladě oboustranné atrofie optického nervu (*viz obr. 6.2.1A a B*). Významně zhoršená byla i kontrastní citlivost (0,45 OP; 0,60 OL) a barvocit (zcela chaotické řazení barev bilaterálně). Vyšetření perimetru ukázalo rozsáhlé centrocekální skotomy s pouze ojedinělými ostrůvky zachovaného periferního vidění (*viz obr. 6.2.1C a D*). Vyšetření tloušťky vrstvy nervových vláken (RNFL – *retinal nerve fibre layer*) pomocí optické koherenční tomografie se spektrální doménou (SD-OCT) potvrdilo její snížení ve všech kvadrantech OP s relativním zachováním oblasti nazálního kvadrantu OL (*viz obr. 6.2.1E a F*).

Po 2 letech od prvních příznaků byl pacient doporučen ke genetickému vyšetření. Na základě klinického průběhu a výsledků oftalmologických vyšetření bylo vysloveno podezření na mitochondriální etiologii onemocnění – Leberovu hereditární neuropatii optiku (LHON), která byla potvrzena vyšetřením mitochondriální DNA (mtDNA). U pacienta byla nalezena prevalentní homoplazmická mtDNA mutace 11778G>A v genu *MT-ND4*. Genetické a molekulární vyšetření v rodině ukázalo, že homoplazmii pro stejnou mutaci má i jeho teta, sestřenice z matčiny strany a její dvě děti, které jsou klinicky zdravé. Kardiologické a neurologické vyšetření v rámci specializované ambulance vyloučilo LHON *plus* příznaky jak u probanda, tak u jeho rodiny.

Pacientovi je v současnosti 35 let. Klinicky je vyjádřená závažná sekundární anhedonie pro těžkou poruchu zraku, která mu významně snižuje kvalitu života. Přesto je soběstačný a používá řadu pomůcek pro slabozraké (kamerová zvětšovací lupa, čtečka, upravený počítač/tablet a telefon).

Také starší pacientův bratr je nositelem homoplazmické mtDNA mutace 11778G>A v genu *MT-ND4*. Oční vyšetření sice ukazuje, že až na oboustranný astigmatismus má normální zrakovou ostrost (1,0), kontrastní citlivost (1,65), perimetr i barvocit, ale tloušťka vrstvy nervových vláken (RNFL) je zvýšená, což naznačuje možný počínající edém očního nervu. Pro vysoké riziko rozvoje LHON a subklinické známky začínajícího postižení zraku byla zahájena terapie analogem bioaktivního koenzymu Q_{10} (idebenon). V současnosti, dva roky na této terapii, je jeho stav stacionární a zraková ostrost zůstává zachována.

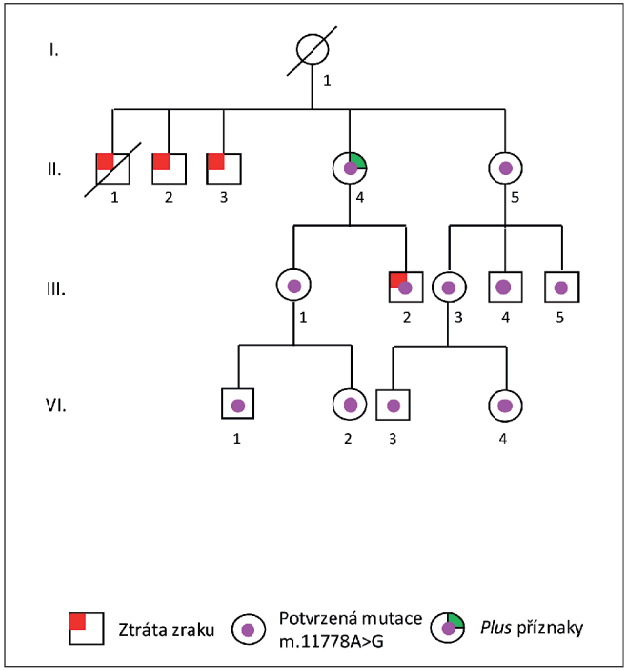


Obr. 6.2.1 Oční nálezy u 27letého muže s Leberovou hereditární neuropatií optiku (LHON) na podkladě m.11778G>A v genu *MT-ND4*, 8 měsíců po nástupu zrakových obtíží:
A, B) Fotografie očního pozadí zobrazující bledou papilu očního nervu pravého (A) a levého (B) oka.
C, D) Standardní automatická perimetrie zobrazující splývavé skotomy v centrální a centrocekální oblasti propagující se do periferie; zachovaný je nazální okrsek zorného pole levého oka (D).
E) Měření tloušťky vrstvy nervových vláken pomocí optické koherenční tomografie se spektrální doménou zachycující redukci tloušťky a ztrátu pruhování v pravém oku.
F) Relativní zachování oblasti nazálního kvadrantu levého oka.

Teoretická část

Etiologie

Leberova hereditární neuropatie optiku (LHON) je onemocnění způsobující významnou ztrátu centrálního vidění na podkladě degenerace retinálních gangliových buněk a zrakového nervu. Jedná se o nejčastější mitochondriální onemocnění s prevalencí nejméně 1 : 10 000. Dědičnost onemocnění je maternální – více než 95 % pacientů nese jednu ze tří homoplazmických bodových mutací v genech mitochondriální DNA (mtDNA): m.11778G>A (*MT-ND4*), m.3460G>A (*MT-ND1*), m.14484T>C (*MT-ND6*). Všechny tři mutace zasahují některou z podjednotek mitochondriálního komplexu dýchacího řetězce I (NADH-koenzym Q_{10} oxidoreduktáza), prvního ze čtyř enzymů dýchacího řetězce. Příklad rodokmenu rodiny s LHON na podkladě mutace m.11778G>A, sledované u nás v ambulanci, je zobrazen na *obr. 6.2.2*.



Obr. 6.2.2 Rodokmen rodiny s mnohočetným výskytem syndromu LHON na podkladě mutace m.11778A>G.
Typická je mnohem vyšší penetrance onemocnění u mužů (náhlá ztráta zraku u II/1, II/2, II/3 – molekulárně geneticky neověřeno pro nespolupráci pacientů; III/3); ženy většinou zůstávají asymptomatickými nosičkami mutace, kterou předávají svým dětem (maternální dědičnost). Výskyt LHON *plus* příznaků u ženy (II/4) s poruchou sluchu a myopatií bez poruchy zraku je poměrně vzácný.

Přítomnost mutace je nezbytným, ale nikoli postačujícím patofyziologickým prvkem pro vznik závažného postižení zraku. Penetrance onemocnění není úplná, k poruchám zraku dochází přibližně u 50 % mužů a 10 % žen. Mezi jednotlivými mutacemi existují rozdíly v tíži projevů i v penetranci onemocnění. Například nositelé nejčastější mutace

m.11778G>A mají výrazně horší prognózu než nositelé mutace m.14484T>C. Většina nositelů mutace v mtDNA pro LHON má mutaci v homoplazmické podobě, což znamená, že všechny kopie mtDNA v těle jsou mutované. Asi 10–15 % osob má mutaci heteroplazmickou a v jejich buňkách a tkáních je současně přítomná populace mutovaných i nemutovaných molekul mtDNA. Tkáňově specifická segregace pak může být odpovědná za rozdílný interindividuální fenotyp.

Přesný mechanismus postižení retinálních gangliových buněk na podkladě dysfunkce komplexu I stále není objasněn. Na rozvoji onemocnění se vedle mutace mtDNA podílejí rovněž faktory zevního prostředí, mezi které patří především aktivní i pasivní kouření, konzumace alkoholu, užívání některých antibiotik a zřejmě i další genetické predispozice na úrovni jaderného či mitochondriálního genomu.

Histochemickými studiemi bylo prokázáno zvýšené nahromadění mitochondrií v oblasti *lamina cribrosa sclerae*, kde ještě nemyelinizovaná nervová vlákna opouštějí sítnici, aby vytvořila oční nerv. Tato oblast je bohatá na enzymy ze skupiny Na^+/K^+-ATPáz, což činí z místního neuronálního vedení energeticky nesmírně náročný proces a může vysvětlit výjimečnou zranitelnost prelaminárních vláken zrakového nervu. Porucha mitochondriálního energetického metabolismu má za následek lokální stázu axoplazmy s otokem a následnou degenerací vrstvy gangliových buněk a zrakového nervu.

Giordano et al. v roce 2014 prokázali, že množství mtDNA u pacientů s LHON negativně koreluje s rozvojem axonálního otoku a dalších subklinických změn, a vyslovili hypotézu, že zvýšená mitochondriální biogeneze na podkladě replikace mtDNA může být významným protektivním faktorem rozvoje manifestního onemocnění.

Klinické příznaky

Průměrný věk při rozvoji zrakových obtíží se pohybuje nejčastěji mezi 15 a 35 roky, avšak klinické obtíže mohou nastat kdykoli od kojeneckého věku až do 70 let. Onemocnění obvykle začíná rychlou nebolestivou ztrátou zrakové ostrosti s postupným postižením obou očí během několika týdnů. Následuje fáze stabilizace, při které se již zrakové funkce nezhoršují a výjimečně se mohou i zlepšovat, a to častěji u mladších osob s mutací m.14484T>C. U většiny postižených však dochází k další progresi do chronické fáze onemocnění s významnou ztrátou zrakových funkcí a někdy i kompletní atrofií zrakového nervu, při níž je zraková ostrost snížená až do pásma praktické slepoty (≤ 0,1). I pacienti s mírnější formou LHON si stěžují na rozsáhlé centrální skotomy.

V akutní fázi bývá na očním pozadí patrné rozšíření cév s možnými tortuozitami. V okolí disku dochází k elevaci RNFL, což při oftalmoskopii vytváří dojem edému. Na optické koherenční tomografii (OCT) lze paralelně pozorovat progresivní ztlušťování peripapilárních nervových vláken. Při vyšetření zrakových evokovaných potenciálů (VEP) a elektroretinografie (ERG) v akutní fázi zaznamenáváme snížení amplitud a prodloužení latencí kortikálních odpovědí. S postupnou progresí do atrofie optického nervu dochází naopak ke snižování RNFL, často s nejdelším zachováním oblasti nazálního kvadrantu.

Je zajímavé, že abnormality při fundoskopickém vyšetření i při dalších očních vyšetřeních již byly pozorovány též u jedinců v presymptomatickém stadiu nemoci, a dokonce i u asymptomatických nositelů mutace pro LHON, u nichž pak nedošlo ke ztrátě zraku. Často se jedná pouze o diskrétní změny, které při dalších kontrolách ustupují, nebo dokonce zcela vymizejí. Naopak u jiných pacientů se mohou zvýrazňovat a progredovat do obrazu rozvinuté LHON.

Subklinické odchylky byly pozorovány i v rámci elektrofyziologických vyšetření VEP, ERG a OCT. Livingstone et al. ve studii se 16 asymptomatickými nositeli LHON prevalentní mutace m.11778G>A nalezli jednoho pacienta s alteracemi při vyšetření VEP a navrhli hypotézu, že se může jednat o časnou známku LHON. Jiné studie naopak popsaly významné prodloužení vlny P100 při vyšetření VEP u asymptomatických nositelů mutace m.11778G>A, kteří se nikdy nemanifestovali ztrátou zraku. Je tedy více než pravděpodobné, že strukturní změny nemusejí korelovat s klinickým fenotypem a prediktivní hodnota vyšetření VEP i dalších funkčních a zobrazovacích vyšetření stále zůstává nejasná.

Přestože se LHON nejčastěji projevuje jako onemocnění s izolovaným postižením zrakových nervů, v některých případech se mohou objevit i další komplikace (tzv. **LHON *plus***), mezi něž patří převodní poruchy sluchu, poruchy srdečního rytmu, periferní neuropatie a další neurologické projevy, které mohou mít závažný dopad, například při postižení bazálních ganglií. Diferenciálně diagnostická rozvaha nad pacienty s neuropatií optiku však kromě LHON zahrnuje i pacienty s jinými nemocemi. Z mitochondriálních poruch se nejčastěji jedná o **dominantní optickou atrofii (DOA)** na podkladě mutací v genu *OPA1*.

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření a oftalmologickém vyšetření, ale je nutné ji potvrdit molekulární analýzou mutací mtDNA ve vzorku DNA z krve, močového sedimentu, vlasových folikulů nebo buněk stěru bukální sliznice. V případě pozitivního nálezu je vhodné doplnit genetické vyšetření i u všech maternálních příbuzných. Pozitivní nález u asymptomatických nositelů mutace mtDNA pro LHON sice neumožňuje predikovat rozvoj nemoci, ale dovoluje provést určitá preventivní opatření a genetické poradenství.

Na rozdíl od jiných mitochondriálních onemocnění nemají pacienti s LHON zvýšenou hladinu laktátu v krvi ani mozkomíšním moku.

Pro vyšetření LHON *plus* příznaků, které mohou být dle našich zkušeností také vyjádřeny subklinicky, je v konkrétních případech vhodné doplnit audiologické, neurologické, elektrofyziologické a kardiologické vyšetření.

Léčba

Možnosti terapie pacientů s LHON jsou stále velmi omezené. Určité naděje v poslední době přinesla léčba chinonovým analogem koenzymu Q_{10} (idebenon), který obchází a částečně i snižuje dopad poruchy komplexu I na energetický metabolismus. Idebenon u některých pacientů vede ke zlepšení barvocitu a návratu zrakové ostrosti, pokud je léčba zahájena co nejdříve, nejpozději do 2–5 let od začátků onemocnění. Jako nadějná se jeví i terapie jinou formou koenzymu Q_{10}, α-tokotrienolchinonem (EPI-743), který v několika menších studiích vedl ke stabilizaci onemocnění a u části nemocných i ke zlepšení zrakové ostrosti.

V září 2015 navíc byla zahájena III. fáze klinických zkoušek genové terapie GS010 u pacientů s LHON na podkladě mutace m.11778G>A, která je založená na intravitreální aplikaci rekombinantního adenoasociovaného viru 2 nesoucího gen pro podjednotku ND4 komplexu I dýchacího řetězce. První studie, kterou publikovali Wan et al. v roce 2016, prokázala jednoznačné zlepšení zrakové ostrosti a zorného pole bez doprovodného zvýšení tloušťky vrstvy nervových vláken při měření OCT či VEP; na hodnocení účinnosti je však třeba ještě vyčkat.

Centralizace péče o pacienty s neuropatiemi optiku v České republice

Výsledky nových léčebných metod u pacientů s LHON jsou sice slibné, ale zdůrazňují především potřebu včasné diagnostiky. Neúplná penetrance a variabilita klinických

projevů často vedou k diagnostickým rozpakům a pozdnímu určení diagnózy, jež má za následek opožděné zahájení léčby.

Ve spolupráci oční, neurologické a dětské kliniky a laboratoře pro studium mitochondriálních chorob vzniklo v rámci 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze specializované pracoviště pro diagnostiku a léčbu pacientů s neuropatiemi optiku. Jeho dalším cílem je i vyhledávání a dispenzarizace pacientů s LHON *plus* příznaky. V rámci tohoto pracoviště bylo zatím diagnostikováno 160 pacientů s LHON, 17 pacientů s DOA a 8 pacientů s jinými příčinami optické neuropatie.

U 8 nemocných (5 LHON, 2 DOA, 1 LHON/MELAS překryvný syndrom) byla zahájena terapie idebenonem v období od 4 týdnů do 9 měsíců od začátku prvních příznaků postižení zraku, která u poloviny pacientů vedla k jednoznačnému zlepšení zrakových funkcí. Zatím úspěšná je i léčba 3 nemocných s LHON se známkami preklinického postižení zraku. Jeden pacient byl díky včasné diagnostice LHON zařazen do III. fáze klinických zkoušek genové terapie v Mnichově.

Práce byla podpořena MZ ČR AZV 16-32341A a GAUK 38515.

Literatura:

1. Bristow EA et al.: The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophtalmol* 2002; 120: 791–796.
2. Carelli V et al.: Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23: 53–89.
3. Giordano C et al.: Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain* 2014; 137: 335–353.
4. Howell N: Leber hereditary optic neuropathy: respiratory chain dysfunction and degeneration of the optic nerve. *Vision Res* 1998; 38: 1495–1504.
5. Livingston IR et al.: Leber's optic neuropathy: clinical and visual evoked response studies in asymptomatic and symptomatic members of a 4-generation family. *Br J Ophthalmol* 1980; 64(10): 751–757.
6. Newman NJ: Leber's hereditary optic neuropathy. New genetic considerations. *Arch Neurol* 1993; 50: 540–548.
7. Nikoskelainen EK et al.: Ophthalmologic findings in Leber hereditary optic neuropathy, with special reference to mtDNA mutations. *Ophthalmology* 1996; 103: 504–514.
8. Riordan-Eva P et al.: The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain* 1995; 118: 319–337.
9. Rudolph G et al.: Effects of idebenone on color vision in patients with leber hereditary optic neuropathy. *J Neuroophthalmol* 2013; 33(1): 30–36.
10. Sacai PY et al.: Visual evoked potentials findings in non-affected subjects from a large Brazilian pedigree of 11778 Leber's hereditary optic neuropathy. *Doc Ophtalmol* 2010; 121: 147–154.
11. Sadun AA et al.: Mitochondrial optic neuropathies: our travels from bench to bedside and back again. *Clin Experiment Ophtalmol* 2013; 41: 702–712.
12. Savini G et al.: Retinal nerve fiber layer evaluation by optical coherence tomography in unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy mutations. *Ophtalmology* 2005; 112: 127–131.
13. Wan X et al.: Efficacy and safety of rAAV2-ND4 treatment for Leber's hereditary optic neuropathy. *Sci Rep* 2016; 6: 21587.
14. Yu-Wai-Man P et al.: The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 333–339.
15. Ziccardi L et al.: Retinal function and neural conduction along the visual pathways in affected and unaffected carriers with Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Ophtalmol Vis Sci* 2013; 54: 6893–6901.

6.3 Deficit pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDHc)

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

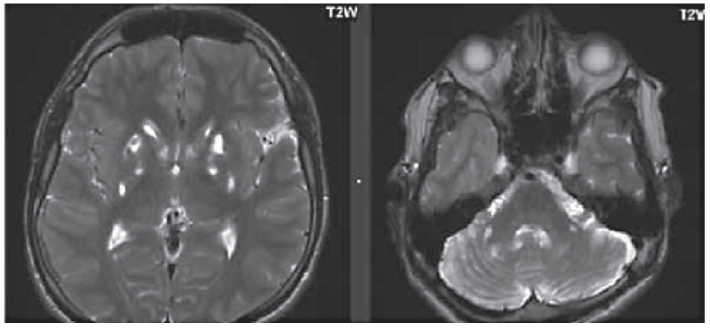
Kazuistika

Chlapec se narodil ze šestého těhotenství ve 38. týdnu gestace s porodní hmotností 2700 g a délkou 49 cm. Rodiče i sourozenci jsou zdrávi. Poporodní adaptace byla v normě, ale od druhého měsíce se rozvíjela centrální hypotonie s opakovanými stavy apatie spojenými s bloudivými pohyby očí. Rozvinul se pravostranný hemisyndrom. Ve věku 2 let chlapec měřil 83 cm (5. percentil), vážil 8,4 kg (< 1. percentil) a obvod hlavy činil 46 cm (1,6. percentil). Vývoj byl prakticky zastaven na úrovni I. trimenonu. Pro ataky klonických křečí byla zahájena antiepileptická terapie. CT vyšetření mozku v kojeneckém věku ukázalo atrofii frontálních laloků. MRI vyšetření ve věku 6 let zobrazilo bilaterální symetrické nekrotické léze v bazálních gangliích odpovídající Leighovu syndromu.

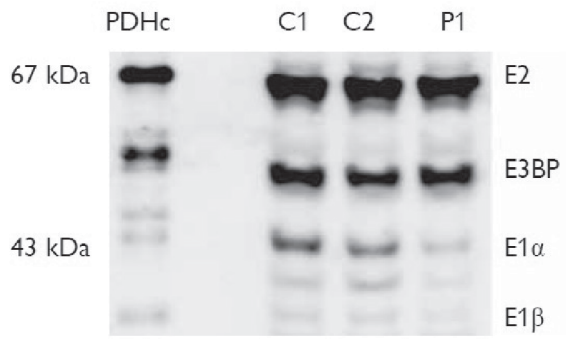
Chlapci je nyní 15 let, má poruchu růstu, neprospívá a má mikrocefalii (výška 148 cm, < 0,1. percentil, -3,37 SDS; váha 28 kg, 1. proporcionální percentil, -2,34 SDS; obvod hlavy 50 cm, < 0,1. percentil, -3,47 SDS). Je na plenách, nechodí, neleze, používá pouze několik slov a komunikace je zejména neverbální. Má mírnou faciální dysmorfii, kyfoskoliózu, protruzi sterna, těžkou spastickou kvadruparézu s kontrakturami velkých i malých kloubů. Epilepsie je kompenzována klonazepamem. Po dohodě s rodiči nebyla léčba ketogenní dietou pro závažný stav chlapce indikována.

Kontrolní MRI mozku v 15 letech ukázalo atrofii mozečku a symetrické hyperintenzity v *putamen* a *globus pallidus* (*viz obr. 6.3.1*). Enzymatické vyšetření pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDHc) ukázalo nízkou aktivitu PDHc ve svalové i jaterní biopsii (*viz tab. 6.3.1*), aktivita PDHc v izolovaných lymfocytech byla snížená jen mírně. Analýzy proteinového složení PDHc ve svalu vykázaly výrazně snížené množství podjednotek E1α a E1β, naopak množství podjednotek E2 a E3 bylo stejné jako u kontrol (*viz obr. 6.3.2*).

Diagnóza byla potvrzena i na molekulární úrovni. Chlapec je hemizygot pro mutaci c.857C>T; p.Pro250Leu v genu *PDHA1* lokalizovaném na chromosomu X. Jedná se o *de novo* vzniklou mutaci, která nebyla prokázána u chlapcovy matky.



Obr. 6.3.1 MRI mozku u 15letého chlapce s poruchou PDHc a Leighovým syndromem (T2-vážený obraz). Na prvním snímku jsou přítomné bilaterální symetrické hyperintenzity v *ncl. putamen*, *caudatus* a *globus pallidus*. Druhý snímek dokumentuje atrofii mozečku a hyperintenzity v *nlc. dentatus* a *pedunculus cerebelli medius (Magner a kol., 2011).*



Obr. 6.3.2 **Imunoblot podjednotek pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDHc) v mitochondriích izolovaných ze svalové biopsie u chlapce s poruchou PDHc (P1) ukazuje výrazně snížené množství podjednotek E1α a E1β ve srovnání s kontrolou (C1, C2).**

Tab. 6.3.1 **Biochemická a enzymatická vyšetření u 15letého chlapce s poruchou pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDHc)**

Laboratorní vyšetření (jednotka)	Pacient	Kontroly
ALT (μkat/l)	2,3	< 0,6
AST (μkat/l)	5,9	< 0,6
Kyselina močová (μmol/l)	490	120–340
Laktát v krvi (mmol/l)	2,4–4,3	< 2,3
Poměr laktát/pyruvát	11,6	10–20
Laktát v likvoru (mmol/l)	5,7	< 2,1
Alanin v séru (μmol/l)	1248	< 500
Aktivita PDHc (nmol $^{14}CO_2$/min/mg proteinu) – v lymfocytech – ve svalu – v játrech	 0,14–0,26 0,128 0,064	 0,25–2,2 2–6,2 0,2–4,6

Teoretická část

Etiologie

Oxidace pyruvátu probíhá v mitochondriálním pyruvátdehydrogenázovém komplexu (PDHc). Jedná se o regulační krok v aerobní oxidaci glukózy (přeměna pyruvátu vzniklého z glykolýzy na acetyl-CoA), který má klíčové místo v procesu získávání buněčné energie. PDHc je velký multienzymový komplex asociovaný s vnitřní mitochondriální membránou. Je tvořen mnoha podjednotkami pyruvátdehydrogenázy (E1 složené ze dvou podjednotek E1α a E1β), dihydrolipoamidtransacetylázy (E2), dihydrolipoamiddehydrogenázy (E3) a proteinu vázajícího dihydrolipoamiddehydrogenázu (E3BP). Součástí PDHc je i pyruvátdehydrogenázakináza (PDK) a pyruvátdehydrogenázafosfatáza (PDP), které pomocí fosforylace/defosforylace ovlivňují aktivitu PDHc.

Poruchy oxidace pyruvátu patří mezi nejčastější poruchy mitochondriálního energetického metabolismu v dětském věku. Nejčastější je porucha E1α podjednotky PDHc v důsledku mutací genu *PDHA1*, který je lokalizován na chromosomu X (Xp22). I když je dědičnost onemocnění vázaná na chromosom X, přesto se výrazně neliší počet postižených chlapců a děvčat. Tento fenomén lze částečně vysvětlit zešikmenou inaktivací chromosomu X u postižených dívek a zároveň i tím, že část mutací u postižených dívek je letální pro mužské plody. Poruchy ostatních podjednotek PDHc jsou méně časté. Vzácně může být onemocnění způsobeno rovněž kofaktory a přenašeči, které se podílejí na regulaci funkce PDHc *(viz tab. 6.3.2)*. Dědičnost těchto poruch PDHc je autosomálně recesivní.

Tab. 6.3.2 **Přehled proteinů a neproteinových kofaktorů podílejících se na oxidaci pyruvátu**
(upraveno dle: Sperl et al., 2015)

Strukturní podjednotky PDHc	• pyruvátdehydrogenáza (E1α) • pyruvátdehydrogenáza (E1β) • dihydrolipoamidtransacetyláza (E2) • dihydrolipoamiddehydrogenáza (E3) • E3-binding protein
Import pyruvátu	• mitochondriální pyruvátový přenašeč (MPC1, MPC2)
Poruchy regulace PDHc	• pyruvátdehydrogenázová kináza (PDK1–4) • pyruvátdehydrogenázová fosfatáza (PDP1, PDP2) • regulační podjednotka pyruvátdehydrogenázové fosfatázy (PDPR)
Kofaktory PDHc	• thiaminpyrofosfát (thiaminový přenašeč [SLC19A3]; thiaminpyrofosfokináza [TPK1]) • kyselina lipoová (syntetáza kyseliny lipoové [LIAS]; lipoyltransferáza [LIPT1]) • FAD • koenzym A

Klinické projevy

Jsou velice variabilní. Pacienti byli tradičně rozdělováni do tří klinických fenotypů: 1. závažná neonatální manifestace s laktátovou acidózou, faciální dysmorfií a vývojovými vadami CNS; 2. opoždění vývoje s Leighovým syndromem; 3. intermitentní ataxie. Dnes vnímáme poruchy PDHc jako onemocnění s kontinuálním spektrem příznaků – od závažných projevů, které obvykle začínají v novorozeneckém věku, přes mírnější s pozdějším nástupem až po zcela mírné s prakticky normálním vývojem a dystonií jako jediným projevem onemocnění.

Nejčastější příznaky jsou uvedeny v *tab. 6.3.3*. Patří k nim opoždění vývoje, epilepsie, vývojové vady mozku nebo atrofie mozečku, porucha růstu, zraku a sluchu, chorioatetoidní pohyby, dystonické hemiplegie a mozečková symptomatologie. Extrapyramidová symptomatologie vzniká při Leighově syndromu se symetrickými nekrotickými změnami v bazálních gangliích a kmeni. Epilepsie může mít charakter fokálních i generalizovaných záchvatů. Při rozvoji těžší laktátové acidózy je časté Kussmaulovo dýchání, zejména u dětí. Faciální dysmorfie je častější u děvčat než u chlapců (úzká hlava, klenuté čelo, prominující filtrum a široký kořen nosu). Postižení zraku se projeví strabismem, atrofií optických nervů a nystagmem.

Tab. 6.3.3 **Klinické příznaky u 371 pacientů s poruchou pyruvátdehydrogenázového komplexu**
(upraveno dle: Patel et al., 2012)

Klinické projevy	Počet pozitivních případů (n)	Podíl pozitivních případů (%)	Procentuální zastoupení chlapců (%)
Opoždění vývoje	211	57	45
Hypotonie/hypertonie	169	46	51
Křeče	95	26	47
Mikrocefalie	83	22	23
Ataxie	72	19	78
Ataky hyperventilace při acidóze	51	14	59
Dysmorfie	44	11	34
Spasticita	38	10	34
Polyneuropatie	26	7	88
Atrofie optiku	15	4	60
Nystagmus	11	3	64
Ptóza	9	2,5	89
Dystonie	8	2	88
Strabismus	6	1,6	100

Diagnostika

Laktát v krvi je trvale zvýšen u dětí s časným nástupem onemocnění, u ostatních je zvýšen intermitentně. Poměr mezi hladinou laktátu a pyruvátu bývá snížený (< 10). Při nízké hladině laktátu nelze tento diagnostický marker používat. Při zobrazení CNS pomocí MRI je často vidět ventrikulomegalii (35 %) a Leighův syndrom (27 %).

Diagnózu poruchy E1α podjednotky PDHc u chlapců lze stanovit enzymatickým vyšetřením v izolovaných lymfocytech, ve svalové biopsii nebo v kultivovaných fibroblastech, ale u dívek tato vyšetření nejsou dostatečně spolehlivá. Enzymatická diagnostika se uplatňuje i u poruchy PDHc na úrovni dihydrolipoamidtransacetylázy (E2) a dihydrolipoamiddehydrogenázy (E3). Při diagnostice poruch PDHc se uplatňují elektroforetické a imunochemické analýzy, které umějí ve vyšetřované tkáni stanovit proteinové množství a složení PDHc. Množství PDHc lze stanovit i v suché krevní kapce a v buňkách z bukálního stěru.

Vzhledem k velkému počtu genů, které se podílejí na syntéze a regulaci PDHc, se do popředí molekulární diagnostiky dostávají metody sekvenování nové generace.

Léčba

Kauzální terapie není známa. Těžkou laktátovou acidózu, především v době akutních metabolických rozvratů, lze částečně kompenzovat alkalinizační léčbou.

U některých pacientů se uplatňuje ketogenní dieta s vysokým obsahem tuků a výrazně sníženým obsahem cukrů, při které se postupně zvyšuje poměr tuků k cukrům/proteinům na 3–4 : 1. Ketogenní dieta snižuje podíl glykolýzy na energetických potřebách pacienta a podporuje oxidaci mastných kyselin, jež slouží jako hlavní zdroj energie i hlavní zdroj pro tvorbu acetyl-CoA. Ketogenní dietu lze zajistit pomocí speciálních potravin pro zvláštní lékařské účely, které jsou obohacené o ionty a stopové prvky.

Ketogenní dieta je pro pacienta i rodinu velice náročná a vyžaduje rovněž pravidelné klinické a metabolické sledování na specializovaných pracovištích.

U některých pacientů s mírnějším průběhem onemocnění došlo ke klinickému zlepšení svalové slabosti či odeznění atak dystonie i na dietě s nízkým glykemickým indexem, jako je Atkinsonova dieta nebo jednodušší dieta bez monosacharidů (glukóza, fruktóza) a disacharidů (sacharóza, laktóza). Cca u 5 % pacientů s PDHc dochází ke klinickému zlepšení po podání thiaminu (50 mg/kg/den) a biotinu, jež působí jako kofaktory pro funkci PDHc. Především se jedná o pacienty s poruchou thiaminového přenašeče (SLC19A3).

Literatura:

1. Bachmann-Gagescu R et al.: A cognitively normal PDH-deficient 18-year-old man carrying the R263G mutation in the PDHA1 gene. *J Inherit Metab Dis* 2009; 32: Suppl 1.
2. Barnerias C et al.: Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: four neurological phenotypes with differing pathogenesis. *Dev Med Child Neurol* 2010; 52: e1–e9.
3. Gano LB et al.: Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. *J Lipid Res* 2014; 55: 2211–2228.
4. Magner M et al.: Two patients with clinically distinct manifestation of pyruvate dehydrogenase deficiency due to mutations in PDHA1 gene. *Prague Med Rep* 2011; 112: 18–28.
5. Patel KP et al.: The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. *Mol Genet Metab* 2012; 105: 34–43.
6. Quintana E et al.: Mutational study in the PDHA1 gene of 40 patients suspected of pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Clin Genet* 2010; 77: 474–482.
7. Robinson BH et al.: Variable clinical presentation in patients with defective E1 component of pyruvate dehydrogenase complex. *J Pediatr* 1987; 111: 525–533.
8. Sperl W et al.: The spectrum of pyruvate oxidation defects in the diagnosis of mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38: 391–403.

6.4. Deficit proteinu TMEM70

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Chlapec se narodil ze druhé, rizikové gravidity (kvůli oligohydramnionu a intrauterinní růstové retardaci). Oba rodiče jsou zdrávi. Porod byl spontánní ve 40. gestačním týdnu, porodní hmotnost činila 2020 g a délka 44 cm. Po porodu byla zjištěna subkoronární hypospadie, tříselná a umbilikální hernie *(viz obr. 6.4.1A)*, spontánní pneumothorax a hypertrofická kardiomyopatie. Výživu mateřským mlékem dostával kontinuálně sondou kvůli slabému sacímu reflexu *(viz obr. 6.4.1B)*.

Po měsíci se sice rozpil, ale trvale ublinkával a opakovaně zvracel. Neprospíval, nicméně rostl s mírným *catch-up*. Měl dobrý sociální kontakt, avšak vývoj motoriky byl opožděný pro centrální hypotonický syndrom.

Ve věku 4 měsíců, po nočním lačnění před plánovanou operací pravostranné tříselné kýly, se rozvinul těžký metabolický rozvrat s Kussmaulovým dýcháním, laktátovou acidózou (laktát 12 mmol/l, norma < 2,2, BE -22, norma 0 ± 2), hyperamonemií (NH_3

185 µmol/l, norma ≤ 60) a hyperurikemií (kyselina močová 950 µmol/l, norma < 240). Pro progredující poruchu vědomí při stoupající hladině amoniaku (NH_3 350 µmol/l, norma ≤ 60) byl intubován a napojen na umělou plicní ventilaci s nenáročným režimem. Echokardiografické vyšetření potvrdilo hypertrofickou kardiomyopatii (IVS 146 %, LVPW 166 %).

Hyperamonemie byla léčena infuzemi s benzoátem sodným, který zvyšuje vylučování nebílkovinného dusíku močí. Chlapec toleroval jen velmi nízké dávky glukózy, proto bylo nutné hradit jeho energetické potřeby vysokým přívodem tukových emulzí (3,5 g/kg/den). Přechod na enterální výživu byl komplikovaný kvůli pomalé pasáži GIT, která se upravila až 13. den.

Obr. 6.4.1 Chlapec s deficitem TMEM70:
A) tříselná kýla, umbilikální hernie a hypospadie;
B) mírná faciální dysmorfie a výživa nazogastrickou sondou;
C) mírná faciální dysmorfie ve věku 3 let, výživová gastrostomie.

Klinické příznaky u chlapce s neprospíváním, hypotonií, opožděním psychomotorického vývoje, hypertrofickou kardiomyopatií, hypospadií, hyperamonemií a laktátovou acidózou vedly k podezření na mitochondriální poruchu energetického metabolismu na úrovni oxidativní fosforylace nebo β-oxidace mastných kyselin (MK). Vyšetření poruch β-oxidace MK pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie bylo negativní, naopak nález zvýšeného vylučování kyseliny 3-methylglutakonové v moči svědčil pro poruchu ATP-syntázy při deficitu proteinu TMEM70. Následovalo molekulární vyšetření, které ukázalo, že chlapec je v genu pro protein TMEM70 složený heterozygot pro mutace c.[317-2A>G]; [470T>A]; p.[NMD – *nonsense mediated decay*]; [Val150Gln]. Dědičnost je autosomálně recesivní, chlapcovi rodiče jsou zdraví přenašeči.

V současné době je chlapec 3 roky starý, jeho antropometrická data se pohybují pod 3. percentilem (výška 85 cm, hmotnost 9,4 kg, obvod hlavy 45 cm). Během dne má frekventní výživu, kterou mu matka nabízí *per os*, ale v noci potřebuje kontinuální výživu pumpou pomocí perkutánní gastrostomie *(viz obr. 6.4.1C)*. Pro opakované potřeby rychlého intravenózního přístupu má zavedený venózní port.

Samostatně chodí od 24 měsíců věku, má dobrý sociální kontakt, ale vývoj řeči je významně opožděný, zatím používá asi 10 smysluplných slov. Po adekvátní přípravě podstoupil bez komplikací operaci tříselné kýly. Hypertrofická kardiomyopatie neprogreduje (LVPW 158 %, IVS 166 %), pacient je však léčen propranololem pro intermitentní nález preexcitace při holterovském vyšetření. Podávání allopurinolu pro hyperurikemii bylo pro intoleranci léčby ukončeno, hladiny kyseliny močové se bez léčby pohybují při horní hranici normy.

Teoretická část

Etiologie

Onemocnění bylo poprvé popsáno na našem pracovišti ve spolupráci s Fyziologickým ústavem AV ČR v roce 1999. Jednalo se o první nukleárně kódovanou poruchu systému oxidativní fosforylace na úrovni ATP-syntázy s autosomálně recesivním typem dědičnosti. Protein TMEM70 se účastní biogeneze a stabilizace komplexu ATP-syntázy a jeho deficit patří mezi nejčastější onemocnění mitochondriálního energetického metabolismu. Popsáno již bylo více než 60 pacientů.

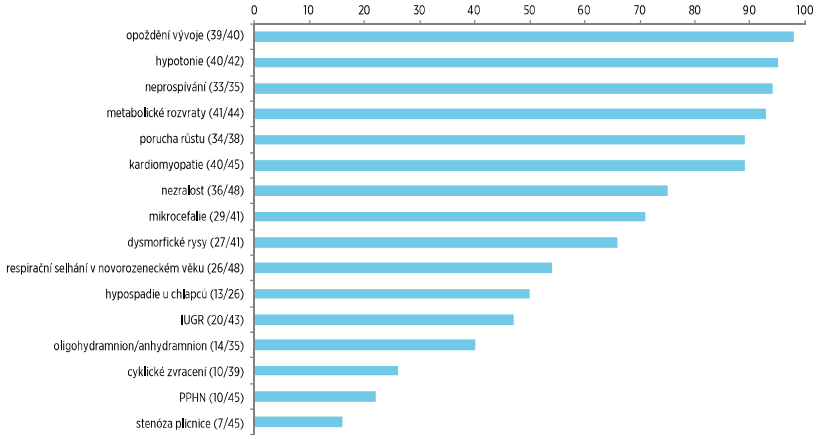
Klinické projevy

Asi třetina matek dětí s deficitem TMEM70 má v průběhu gravidity oligohydramnion. Porod je nezřídka předčasný (medián ve 36. gestačním týdnu) a postižené děti velice často vykazují intrauterinní růstovou retardaci.

Onemocnění se v 85 % případů manifestuje v novorozeneckém období, nejčastěji již během prvních 24 hodin po porodu. Poporodní adaptace je často komplikovaná těžkou hypotonií a poruchou dýchaní vyžadující resuscitaci nebo rozvojem respiračního či kardiálního selhání s nutností umělé plicní ventilace. Kromě časného nástupu hypotonie se běžně vyskytuje i neprogresivní hypertrofická kardiomyopatie a opakované metabolické rozvraty. Obvyklá je mírná faciální dysmorfie a u chlapců hypospadie (55 %), u některých dětí se rozvine plicní hypertenze.

U dětí, které přežijí novorozenecký věk, se rozvíjí neprospívání, porucha růstu, mikrocefalie a dochází k opoždění psychomotorického vývoje. Mezi méně časté příznaky patří tříselná či pupeční kýla, katarakta, strabismus, pigmentová retinopatie *(retinitis pigmentosa)* a koarktace aorty. V rámci multicentrické studie jsme popsali klinický průběh onemocnění u 48 pacientů s deficitem TMEM70. *Obr. 6.4.2* ukazuje několik pacientů s deficitem TMEM70 a na *obr. 6.4.3* uvádíme nejčastější příznaky u dětí s deficitem TMEM70, které přežily novorozenecké období. 10leté přežití dosahuje 63 %.

Obr. 6.4.2 Skupina dětí s deficitem TMEM70: dva nepříbuzní romští chlapci v novorozeneckém věku (1a, 2a) a ve věku 9 měsíců (1b) a 2,5 roku (2b); 5,5letá dívka bez obličejové dysmorfie (3) a detail obličeje chlapce z uvedené kazuistiky (4) *(převzato z: Magner et al., 2015)*



Pozn.: IUGR = intrauterinní růstová retardace; **PPHN** = perzistující plicní hypertenze novorozenců.

Obr. 6.4.3 Nejčastější příznaky u dětí s deficitem TMEM70, které přežily novorozenecké období *(převzato z: Magner et al., 2015)*

Laboratorní vyšetření u dětí s deficitem TMEM70 obvykle ukáže zvýšenou hladinu laktátu a alaninu v krvi, moči i mozkomíšním moku. Zvýšená hladina kyseliny močové je nejspíše způsobena kompeticí s exkrecí laktátu na úrovni buněk renálního tubulu a zároveň dehydratací a katabolickým stavem během metabolických rozvratů spojených zvláště s akutní gastroenteritidou. Během metabolických rozvratů často dochází k hyperamonemii a hyperglykemii v důsledku akutního zhoršení mitochondriálních funkcí a anaerobního zpracovávání glukózy. Metabolické vyšetření organických kyselin v moči ukáže typický nález 3-methylglutakonové acidurie.

Příčina hyperamonémie zatím není dostatečně objasněna. Nicméně při analýze profilu aminokyselin v séru v době katabolismu u našich pacientů s deficitem TMEM70 jsme zaznamenali specifické změny obdobné nálezům u nemocných s poruchou cyklu močoviny na úrovni deficitu karbamoylfosfátsyntetázy (CPS), která pro svojí správnou funkci vyžaduje netypicky 2 molekuly ATP.

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření a molekulárním vyšetření genu *TMEM70*. Homozygotní mutace c.317A>G je typická pro pacienty s deficitem TMEM70 romského původu s časnou manifestací v novorozeneckém období a špatnou prognózou. Naopak u pacientů neromského původu je deficit TMEM70 obvykle způsoben jinými mutacemi v *TMEM70*, některé z nich vedou k pozdějšímu nástupu klinických příznaků a lehčímu průběhu onemocnění. Výjimečně byli popsáni i pacienti s normálním mentálním vývojem.

Diferenciální diagnostika

Uniformním nálezem u dětí s deficitem TMEM70 je zvýšené vylučování kyseliny 3-methylglutakonové, ale tento nález se vyskytuje i u řady dalších mitochondriálních poruch včetně pacientů s Barthovým syndromem. Barthův syndrom je onemocnění s dědičností vázanou na chromosom X způsobené deficitem proteinu tafazzinu. Postižení chlapci mají kromě 3-methylglutakonové acidurie i dilatační kardiomyopatii. Tím se liší od dětí s deficitem TMEM70, které také mají 3-methylglutakonovou acidurii, ale jejich kardiomyopatie je hypertrofická.

Léčba

Většina dětí s deficitem TMEM70 vyžaduje chronickou alkalinizační terapii bikarbonátem sodným, eventuálně v kombinaci se Schollovým roztokem. Pro prognózu dítěte je zásadní terapeutické zvládnutí akutního metabolického rozvratu s laktátovou acidózou, který je často doprovázený i hyperamonemií. Metabolické rozvraty se mohou opakovat v průběhu akutních infekcí, zejména gastrointestinálních, nebo v souvislosti s operačním výkonem.

V infuzní terapii metabolické krize se podává roztok 10% glukózy s ionty a dále vysokodávkové lipidové infuze (až 3,5 g/kg/den po dobu prvních 48–72 hodin). Při hyperamonemii je ke zvážení podání scavengerů amoniaku (benzoátu sodného) a analogu N-acetylglutamátu, eventuálně využití eliminačních metod.

Metabolické rozvraty mohou vést k rozvoji encefalopatie a regresi vývoje. Ve snaze o jejich prevenci, zejména v prvních letech života, je důležitá frekventní výživa, v případě potřeby cestou perkutánní gastrostomie.

Práce byla podpořena MZ ČR AZV 16-33018A.

Literatura:

1. Čížková A et al.: TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalocardiomyopathy. *Nat Genet* 2008; 40: 1288–1290.
2. Honzík T et al.: Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation. *Arch Dis Child* 2010; 95(4): 296–301.

3. Houštěk J et al.: A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1967–1974.
4. Magner M et al.: TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38(3): 417–426.

6.5 Deficit proteinu SCO2

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Dívka se narodila ze druhé gravidity zdravých nepříbuzných rodičů. Prenatální a perinatální anamnéza byla bez rizik a vývoj během prvních 2 měsíců probíhal bez pozoruhodností. Ve 3. měsíci se objevily hypotonie, epizodické ataky snížené motorické aktivity až apatie a atypické pohyby očních bulbů charakteru okulogyrní krize. Psychomotorický vývoj se začal zpomalovat a od 5. měsíce došlo k postupné regresi vývoje.

Dívka měla opakované infekty dolních i horních cest dýchacích a při viróze v 7 měsících věku došlo k respiračnímu selhání, které si vyžádalo dvoudenní umělou plicní ventilaci. Ve 8 měsících, po první epizodě tonických křečí, byla zjištěna porucha vzpřimování, plagiocefalie při predilekci vlevo (obvod hlavy 41,5 cm, < 1. percentil), vyšší svalový tonus, hyperreflexie, mírná kraniofaciální dysmorfie a oboustranná ptóza víček.

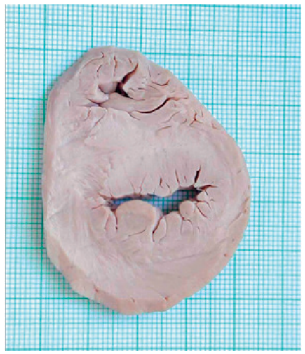
U dívky pokračoval regres vývoje, který ve věku 9 měsíců odpovídal úrovni patologického novorozence. V 10 měsících věku byly přechodně pozorovány epizody dystonie končetin. Opakovaly se generalizované tonické křeče, které ustoupily při terapii fenobarbitalem a midazolamem. Hypertonie odeznívala a stav naopak progredoval do smíšené hypotonie kořenového a axiálního svalstva s hyporeflexií a svalovou atrofií; projevy spasticity zůstaly omezeny na akra dolních končetin. Rozvinul se bulbární syndrom a epizody centrální hypoventilace s nutností umělé plicní ventilace.

V jednom roce věku již dívka byla bez sociálního kontaktu, těžce hypotonická, bez spontánní hybnosti, s areflexií a absencí kmenových reflexů. Neprospívala (hmotnost 6990 g, < 0,1. percentil), měla mikrocefalii (obvod hlavy 42 cm, < 0,1. percentil), výživa byla podávána cestou gastrostomie *(viz obr. 6.5.1)*. Dívka zemřela na kardiopulmonální selhání ve věku 25 měsíců.

Laboratorní vyšetření ukázala intermitentně zvýšenou hladinu laktátu v krvi (1,5–4,7 mmol/l, norma ≤ 2,3) spolu s metabolickou acidózou, zvýšenou hladinou laktátu v likvoru (3,23 mmol/l, norma ≤ 2,1) a moči (118,6 mg/g kreatininu, norma ≤ 70) a hepatopatií (ALT 4,06 μkat/l, norma < 0,85; AST 0,95 μkat/l, norma < 0,97). Echokardiografické vyšetření ukázalo progredující hypertrofickou kardiomyopatii, na *obr. 6.5.2* je vidět řez srdcem při autopsii. CT vyšetřeni mozku ve věku 10 měsíců ukázalo difuzní atrofii CNS, kontrolní MRI ve 13. měsíci ukázalo kromě atrofie i změny odpovídající Leighově syndromu *(viz obr. 6.5.3)*. Elektroencefalografické vyšetření ve 12 měsících prokázalo nízkovoltážní nediferencovanou aktivitu. EMG vyšetření dokumentovalo snížený počet činných motorických jednotek a známky myogenní léze.

Molekulárně genetické vyšetření indikované pro podezření na spinální muskulární atrofii typu I bylo negativní. Histologické vyšetření svalové biopsie ukázalo fenomén mozaikovité atrofie vláken II. typu při hypertrofii vláken I. typu. Enzymatické vyšetření svalu vykázalo mírně sníženou aktivitu komplexů dýchacího řetězce IV (cytotochrom *c*

Obr. 6.5.1 13měsíční dívka s poruchou komplexu cytochrom *c* oxidázy a deficitem proteinu SCO2



Obr. 6.5.2 Sekční nález rozvinuté kardiomyopatie u dívky s poruchou komplexu cytochrom *c* oxidázy a deficitem proteinu SCO2.
(Z archivu prof. MUDr. Milana Elledera, DrSc.)

Obr. 6.5.3 MRI CNS u 13měsíční dívky s poruchou komplexu cytochrom *c* oxidázy a deficitem proteinu SCO2.
V oblasti dorzální části *putamen* a *substantia nigra* jsou stranově symetrická ložiska zvýšeného signálu v T2-váženém obrazu. Myelinizace je mírně opožděná. Subarachnoideální prostory na bazi i konvexitě jsou rozšířeny, zvláště frontotemporálně, což lze klasifikovat jako středně těžkou až těžkou atrofii.
(S laskavostí poskytla Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a VFN v Praze.)

oxidázy [COX]) se sníženým poměrem mezi cytochrom *c* oxidázou a kontrolním enzymem citrátsyntázou (COX/CS) na cca 50 %. Enzymatické vyšetření v kultivovaných fibroblastech bylo v normě, ale postmortální analýzy ukázaly výrazně sníženou aktivitu COX

v játrech a mozku. Elektroforetické analýzy v různých tkáních potvrdily snížené množství proteinu SCO2 a poruchu asemblace cytochrom *c* oxidázy. Diagnóza deficitu SCO2 byla potvrzena na molekulárně genetické úrovni, dívka má v genu *SCO2* homozygotní mutaci c.418G>A; p.Glu140Lys, oba rodiče jsou zdraví heterozygoti.

Teoretická část

Etiologie

Cytochrom *c* oxidáza (COX, komplex dýchacího řetězce IV) je složena ze 14 proteinových podjednotek. Tři podjednotky, kódované mitochondriální DNA, tvoří katalytické jádro enzymu, ostatní podjednotky, kódované nukleárními geny, se podílejí na regulaci aktivity a asemblaci komplexu. Biogeneze enzymu je komplexní proces, který probíhá v několika krocích a vyžaduje přes 30 různých asemblačních proteinů. Jedním z nich je metalochaperon mědi – protein SCO2, který je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně.

Deficit SCO2 je po deficitu proteinu SURF1 *(viz kap. 6.6)* druhou nejčastější příčinou poruchy asemblace COX v naší populaci. Onemocnění bylo pod obrazem infantilní kardioencefalomyopatie popsáno v roce 1999 (Papadopoulou et al.).

Klinické projevy

Poporodní adaptace a počáteční vývoj probíhají u většiny dětí s deficitem SCO2 bez problémů. Mezi první příznaky onemocnění, které se obvykle objevují v novorozeneckém či kojeneckém věku, patří stridor, progredující hypotonie a zpomalení psychomotorického vývoje, po kterém následuje rychlý regres, často v průběhu akutního horečnatého infektu. Průběh nemoci může připomínat spinální muskulární atrofii *(viz tab. 6.5.1)*.

Jen výjimečně, obdobně jako u naší pacientky, se v kojeneckém věku přechodně objeví i hypertonie. Častá je hypertrofická kardiomyopatie. U části dětí se objevují ptóza, tremor, fascikulace jazyka, dystonie, ataxie, abnormní pohyby bulbů, někdy nystagmus nebo strabismus a perzistující horečnatý stav v rámci hypotalamické dysfunkce.

Tab. 6.5.1 Klinická manifestace u 56 (včetně 12 českých) dětí (27 chlapců a 29 dívek) s poruchou komplexu cytochrom *c* oxidázy a deficitem proteinu SCO2 *(upraveno dle: Vondráčková et al., 2014)*

Klinické příznaky	Počet pozorování	Procentuální výskyt příznaků
Intrauterinní růstová retardace	3/33	9 %
Nedonošenost	2/34	6 %
Inspirační stridor	27/44	61 %
Hypotonie	56/56	100 %
Leighův/*Leigh-like* syndrom	15/51	29 %
Opoždění vývoje/regres	34/34	100 %
Extrapyramidová symptomatologie	3/29	10 %
Křeče	14/48	29 %
Ptóza	10/46	22 %
Hypertrofická kardiomyopatie	40/54	74 %
SMA-*like* fenotyp*)	23/41	56 %

Pozn.: *) fenotyp připomínající spinální muskulární atrofii typu I (Werdnigova-Hoffmannova nemoc).

Prognóza onemocnění je krajně nepříznivá. Děti, u kterých se onemocnění manifestuje v prvních měsících života, obvykle umírají na kardiorespirační selhání již v kojeneckém věku. Děti s pozdějším nástupem klinických příznaků onemocnění umírají ve věku 2–4 let. Všechny děti z našeho souboru s manifestací v novorozeneckém věku zemřely do 3 měsíců, průměr délky života u dětí s manifestací v kojeneckém věku činil 11,7 ± 7 měsíců.

Diagnostika

Nález při MRI mozku u postižených dětí dokumentuje atrofii mozku a mozečku. V jedné třetině případů se nacházejí změny odpovídající Leighově syndromu (symetrická nekrotická ložiska v bazálních gangliích a kmeni). Hladina laktátu v krvi, moči i mozkomíšním moku bývá zvýšená, především v období horečnatých infektů. Metabolické vyšetření ukáže zvýšené vylučování 2-oxoglutarátu, eventuálně dalších intermediátů Krebsova cyklu.

Při histologickém vyšetření svalové biopsie jsou nacházeny neuropatické změny, které mohou připomínat nález u spinální svalové atrofie. Histochemické vyšetření může ukázat přítomnost COX-negativních vláken a enzymatické vyšetření mírně sníženou aktivitu COX, ale snížená aktivita COX je přítomná i u řady dalších onemocnění.

Diagnostika je proto vždy založena na molekulárně genetickém vyšetření a průkazu patogenních mutací v genu *SCO2*. Dědičnost onemocnění je autosomálně recesivní, prenatální diagnostika je dostupná.

Léčba

Pouze symptomatická. Eventuální metabolickou acidózu lze kompenzovat alkalizační terapií.

Literatura:

1. Magner M et al.: Mitochondriální encefalomyopatie na podkladě deficitu proteinu Sco2 s obrazem SMA-like neurogenní svalové atrofie – kazuistiky. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 2010; 73/106: 73–75.
2. Papadopoulou LC et al.: Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 1999; 23(3): 333–337.
3. Pronicka E et al.: The natural history of SCO2 deficiency in 36 Polish children confirmed the genotype-phenotype correlation. *Mitochondrion* 2013; 13: 810–816.
4. Vondráčková A et al.: Large copy number variations in combination with point mutations in the TYMP and SCO2 genes found in two patients with mitochondrial disorders. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 431–434.

6.6 Deficit proteinu SURF1

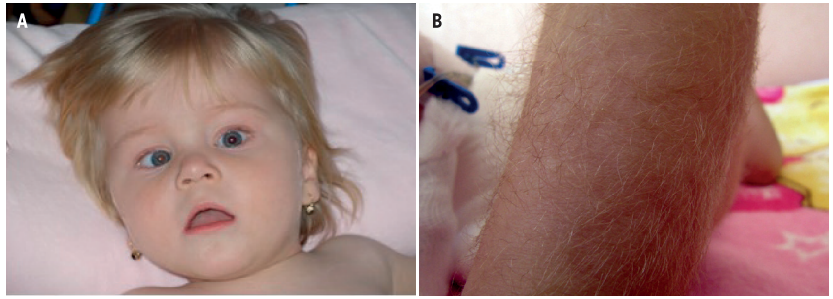
Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Dívka se narodila v termínu, s normální poporodní adaptací. Vývoj hrubé motoriky byl zprvu v normě (lezla od 8. měsíce), ale poté došlo ke zpomalení, s rozvojem samostatné chůze až ve věku 16 měsíců. Při stoupání se vždy potřebovala přidržovat, nicméně vývoj

řeči odpovídal věku. Antropometrická data byla v normě, hraniční byl pouze růst na 8. percentilu.

Stav dívky se náhle zhoršil po proběhlé gastroenteritidě ve věku 21 měsíců. Přestala chodit, rozvinula se u ní koordinační porucha s třesem, ale vývoj řeči byl stále v normě. Pozitivním rysem byla i dobrá komunikace a zájem o okolí. Dívka měla „obličej panenky", s dlouhými řasami, konvergentním strabismem (*viz obr. 6.6.1A*) a hypertrichózu na horních i dolních končetinách a mezi lopatkami (*viz obr. 6.6.1B*). Podle matky mívala časté ataky prohloubeného dýchání, které se zhoršovaly v průběhu horečnatých infekcí a pro které byla doporučena i do plicní ambulance k vyloučení astmatu.



Obr. 6.6.1 Dívka s deficitem proteinu SURF1 ve věku 3 let (A). Výrazná hypertrichóza na předloktí (B).

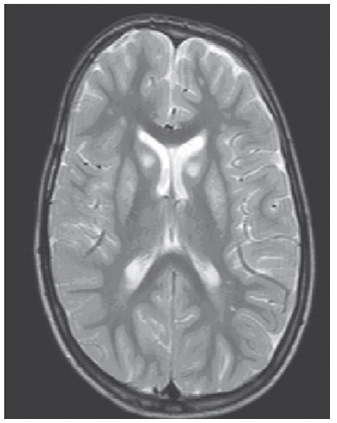
EMG vyšetření ukázalo zpomalené motorické vedení na horních i dolních končetinách bez myogenní léze, SEP byly v normě. EKG a echokardiografie byly bez patologického nálezu. Astrup mimo ataku hyperpnoe vykazoval normální parametry krevních plynů. V likvoru byla proteinocytologická disociace se zvýšenou proteinorachii (0,59 g/l, norma ≤ 0,35) a zvýšenou koncentrací laktátu (3,6 mmol/l, norma ≤ 2,1 mmol/l). MRI vyšetření CNS bylo bez patologického nálezu a sérologická a PCR vyšetření neprokázala infekční etiologii onemocnění. Imunologické vyšetření bylo negativní a celkový stav nesvědčil pro akutní polyneuropatii (Guillainův-Barrého syndrom). V terapii byla zkoušena kúra s kortikoidy, nicméně léčba nebyla úspěšná. Objevila se mozečková symptomatologie. Molekulárně genetické vyšetření vyloučilo Charcotovu-Marieovu-Toothovu nemoc IA.

Při metabolickém vyšetření ve věku 3 let byla přítomná metabolická acidóza s BE -8,5 mmol/l (norma ± 2) kompenzovaná Kussmaulovým dýcháním (pCO_2 2,8 kPa, norma 4,6–6), mírná hyperlaktacidurie (50 mmol/mol kreatininu, norma ≤ 40), mírně zvýšená koncentrace laktátu v krvi (2,65 mmol/l, norma ≤ 2,3) a významně zvýšená koncentrace laktátu v likvoru (4,29 mmol/l, norma ≤ 2,1). Klinický průběh onemocnění a hyperlaktacidemie vedly k podezření na mitochondriální etiologii onemocnění.

Spektrofotometrické vyšetření komplexů dýchacího řetězce v kultivovaných fibroblastech ukázalo sníženou aktivitu cytochrom *c* oxidázy (5,33 nmol/min/mg proteinu, kontroly 18–40) a snížený poměr mezi aktivitami cytochrom *c* oxidázy a referenčního enzymu citrátsyntázy (0,07, kontroly 0,3–0,7). Molekulární analýza genu pro protein SURF1 ukázala, že dívka je složená heterozygotka dvou patogenních mutací: c.[754_755delAG]; [845_846delCT]; p.[Ser252Hisfs*39]; [Ser282Cysfs*9].

Kontrolní MRI vyšetření mozku ve věku 3 let ukázalo symetrická nekrotická ložiska v bazálních gangliích konzistentní s Leighovým syndromem (*viz obr. 6.6.2*).

V 6 letech měla dívka těžkou poruchu růstu (výška 103 cm, 0,3. percentil, -2,64 SDS), neprospívala (hmotnost 11,3 kg, < 0,1. percentil, -4,06 SDS), obvod hlavy byl v normě. Měla časté ataky zvracení bez přímé souvislosti s jídlem či aktivitou. V neurologickém nálezu dominovala těžká porucha hybnosti, výrazný paleo- i neocerebelární syndrom, polyneuropatie a kvadruspasticita. Rozvinul se bulbární syndrom a dysartrie. Mluvila pomalu, řeč byla hůře srozumitelná, ale stále ještě dokázala říci říkanku na úrovni 2,5letého dítěte.



Obr. 6.6.2 MRI vyšetření mozku u 3leté dívky s deficitem proteinu SURF1 a Leighovým syndromem ukazuje oboustranné nekrotické změny v bazálních gangliích (T2-vážené obrazy).
(S laskavostí poskytla Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a VFN v Praze.)

Kardiologické vyšetření ukázalo mírnou hypertrofickou kardiomyopatii (interventrikulární septum 142 %) se sníženou kontraktilitou myokardu. Dívka zemřela ve věku 8 let na respirační insuficienci v průběhu akutního respiračního onemocnění.

Při histologickém a histochemickém vyšetření svalu odebraného až během autopsie byl nalezen mírný myopatický vzorec a prakticky nulová aktivita cytochrom *c* oxidázy. Tomu odpovídalo rovněž spektrofotometrické vyšetření, které ukázalo sníženou aktivitu cytochrom *c* oxidázy (15,7 nmol/min/mg proteinu, kontroly 120–229) a nízký poměr mezi aktivitami cytochrom *c* oxidázy a citrátsyntázy (0,20, kontroly 0,9–1,6).

Teoretická část

Etiologie

Deficit proteinu SURF1 je závažné mitochondriální onemocnění s autosomálně recesivním typem dědičnosti a zároveň je i nejčastější příčinou Leighova syndromu v naší populaci. SURF1 je důležitý protein pro asemblaci cytochrom *c* oxidázy (komplex dýchacího řetězce IV). Cytochrom c oxidáza tvoří v systému oxidativní fosforylace ve vnitřní mitochondriální membráně protonový gradient potřebný pro ATP-syntázu, která vyrábí ATP z ADP a anorganického fosfátu.

Onemocnění popsal v roce 1951 britský patolog Denis Leigh u chlapce s těžkou encefalopatií, který zemřel na respirační selhání. Chlapcův vývoj byl zpočátku normální, postupně se však objevila apatie, hluchota, kvadruspasticita a atrofie zrakového nervu. Při pitvě byly nalezeny oboustranné, fokální a symetrické nekrotické léze v oblasti bazálních ganglií a prodloužené míchy podobné změnám nalezeným při pitvě zemřelé

dívky, u které jsme prokázali deficit proteinu SURF1 *(viz obr. 6.6.3)*. Optický nerv byl demyelinizovaný. Sekční nálezy u dalších pacientů ukázaly rovněž postižení mozečku.

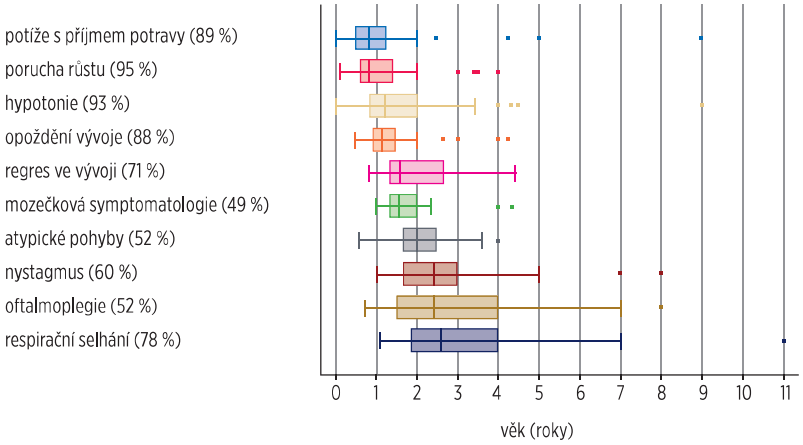
Obr. 6.6.3 Sekční nález u zemřelé dívky s deficitem proteinu SURF1 ukazuje fokální a nápadně symetrické nekrotické léze v oblasti bazálních ganglií.
(Z archivu prof. MUDr. Milana Elledera, DrSc.)

Klinické projevy

Mezi první příznaky, které obvykle začínají mezi 6. a 12. měsícem věku, patří neprospívání a problémy s pitím (89 % případů nemocných s deficitem proteinu SURF1), porucha růstu (95 %), hypotonie (93 %) a opožďování vývoje hrubé motoriky (88 %).

V batolecím věku (medián 19 měsíců) začíná regrese motorického vývoje (71 %), často v souvislosti s akutním horečnatým infektem, rozvíjí se strabismus a oftalmoplegie (52 %) *(viz obr. 6.6.4)*. Progredující postižení motoriky je často v kontrastu s dobrým vývojem mentálních funkcí, jejichž porucha obvykle začíná na přelomu batolecího a předškolního věku. Častá je i hypertrichóza na zádech a končetinách (41 %) a atrofie optiku (23 %). Naopak křeče nebo kardiomyopatie jsou méně časté (14 %).

Prognóza je nepříznivá, onemocnění pomalu progreduje do respiračního selhání, medián úmrtí je před 6. rokem života, jen 16 % dětí se dožije 10 let.



Obr. 6.6.4 Nejčastější příznaky onemocnění u 44 dětí s deficitem proteinu SURF1
(upraveno dle: Wedatilake et al., 2013)

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření, zvýšené hladině laktátu v krvi a/nebo likvoru a nálezu Leighova syndromu při MRI vyšetření mozku (85 %), které ukáže symetrická nekrotická ložiska v bazálních gangliích či kmeni. Ložiska jsou v T2-vážených obrazech hypersignální a v T1-vážených hyposignální. EMG většinou zobrazí známky periferní demyelinizační polyneuropatie (81 %), méně často axonální. Aktivita i proteinové množství cytochrom *c* oxidázy v izolovaných lymfocytech nebo kultivovaných fibroblastech je výrazně snížená.

Při dostupností molekulárně genetického vyšetření genu *SURF1*, který kóduje protein SURF1, se v dnešní době u dětí s podezřením na deficit tohoto proteinu neprovádí svalová biopsie.

Léčba

Kauzální léčba není známa, nutná je symptomatická a sociální terapie. Podávání bikarbonátu sodného kompenzuje metabolickou acidózu, jinak ovšem průběh onemocnění neovlivňuje. U všech pacientů s mitochondriální poruchou energetického metabolismu je třeba pečlivě zvažovat každý operační výkon pro zvýšené riziko anesteziologických komplikací.

V postižené rodině je nutné genetické poradenství. Prenatální diagnostika je dostupná na enzymatické i molekulárně genetické úrovni.

Literatura:

1. Böhm M et al.: Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency. *Pediatr Res* 2006; 59(1): 21–26.
2. Piekutowska-Abramczuk D et al.: SURF1 missense mutations promote a mild Leigh phenotype. *Clin Genet* 2009; 76: 195–204.
3. Wedatilake Y et al.: SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 96.

7

Peroxisomální onemocnění

7.1 Zellwegerův syndrom

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Chlapec se narodil z první gravidity nepříbuzných rodičů. Prenatální ultrasonografické vyšetření u plodu v 8. měsíci těhotenství dokumentovalo hraniční dilataci postranních mozkových komor. Po vybavení po spontánním porodu ve 41. gestačním týdnu s porodní hmotností 3720 g a délkou 51 cm chlapec krátce křičel, dále se však objevilo lapavé dýchání s rozvojem cyanózy a atonie. Po insuflaci kyslíkem maskou došlo k přechodné úpravě dýchání, ale v 90. minutě života měl chlapec apnoickou pauzu vyžadující opět stimulaci a oxygenoterapii. Klinicky trvala hypotonie, hyporeaktivita, hyporeflexie, intermitentně při manipulaci třesy končetin, povrchní dýchání s hyposaturacemi vyžadujícími oxygenoterapii do pátého dne po porodu. Pil minimální dávky mateřského mléka ze savičky, zbytek byl podáván nazogastrickou sondou.

Laboratorně byla prokázána středně významná hepatopatie (*viz tab. 7.1.1*). Sonografické vyšetření mozku a ledvin po porodu prokázalo ventrikulomegalii, cysticky změněnou germinální *matrix* oboustranně, cystickou dysplazii ledvin s redukcí parenchymu bez známek obstrukce. Echokardiografické vyšetření ukázalo hemodynamicky nevýznamnou perzistující tepennou dučej a *foramen ovale*. Cytogenetické vyšetření bylo normální s karyotypem 46,XY. V metabolickém vyšetření byl patologický profil mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA – *very long chain fatty acids*), který svědčil pro peroxisomální etiologii onemocnění. Chlapec byl s podezřením na Zellwegerův syndrom přeložen na naše pracoviště (*viz tab. 7.1.1*).

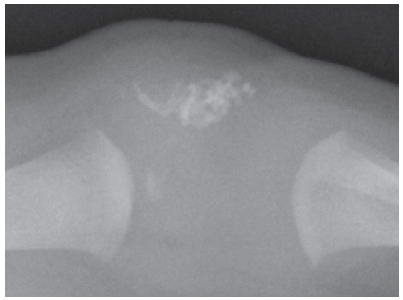
Tab. 7.1.1 Výsledky vybraných laboratorních vyšetření u novorozence s Zellwegerovým syndromem

Parametr	Hodnota	Norma
ALT (μkat/l)	2,49	< 0,6
AST (μkat/l)	5,17	< 0,63
Kreatinin (μmol/l)	64	12–48
Kortisol ranní (nmol/l)	394	118–618
Kyselina pristanová (μg/ml)	1,77	< 0,65
Kyselina hexakosanová – C26 (μg/ml)	1,54	< 0,50
Poměr C26/C22	0,42	< 0,02
Poměr C24/C22	1,941	< 1,09

Délka 54 cm, hmotnost 3590 g i obvod hlavy 36 cm se pohybovaly mezi 12. a 75. percentilem. U chlapce dominovala těžká hypotonie s pozitivními příznaky kružítka, šály i pásovce a pro chybění sacího reflexu byl živen nazogastrickou sondou. Hlava a končetiny chabě visely v trakčním testu i závěsu pod bříškem, spontánní hybnost prakticky chyběla, Morův reflex nešel vybavit. Chlapec měl dolichocefalii a nápadně zvětšenou velkou fontanelu (6×8 cm, *viz obr. 7.1.1*) s rozestupem sagitálního švu a také malá fontanela byla značně prostorná (3×3 cm). Pacient měl epikanty, hypertelorismus, horizontální nystagmus, nízko nasedající ušní boltce (*viz obr. 7.1.1*), nápadně velkou kožní řasu v záhlaví a submandibulárně a na dlaních transpalmární rýhy.

Obr. 7.1.1 Kojenec s Zellwegerovým syndromem. Nápadná je kraniofaciální dysmorfie s vysokým čelem, dolichocefalií, široce zející velkou fontanelou. Přítomná je těžká hypotonie charakteru *floppy infant*.

Vyšetření očního pozadí ve věku 4 měsíců dokumentovalo intraretinálně drobná tečkovitá až okrouhlá a našedlá ložiska odpovídající pigmentové retinopatii. Hladina kortisolu nebyla snížená. Rentgenový snímek patelly dokumentoval charakteristické tečkovité kalcifikace (*calcific stippling*) (*viz obr. 7.1.2*). Chlapec měl opakovaně apnoické pauzy s atakami desaturace, které se upravily na malých dávkách kyslíku. Postupně se prohlubovalo zahlenění, opakované respirační infekty a přidružily se i křeče, pro které byla nasazena antiepileptická terapie fenobarbitalem. Chlapec zemřel při bronchopneumonii ve věku 7 měsíců.



Obr. 7.1.2 Rentgenový snímek patelly kojence s Zellwegerovým syndromem s charakteristickými tečkovitými kalcifikacemi *(calcific stippling)*

Z autoptických vzorků byla histologicky vyšetřena jaterní tkáň, kde kromě disperzní fibrózy mírného stupně bylo na ultrastrukturální úrovni prokázáno úplné chybění peroxisomů a přítomnost tzv. membránových lístků v lysosomech Kupfferových buněk a v makrofázích portálních polí. Tento nález se považuje za příznačný pro Zellwegerův syndrom. Se stanovením definitivní diagnózy nám pomohlo zahraniční pracoviště v Amsterdamu, kde pomocí komplementačních studií na kultivovaných kožních fibroblastech zjistili, že chlapcova peroxisomální porucha odpovídá úrovni peroxinu 1 (PEX1). V případě komplementačních studií se postupně indukuje fúze somatických buněk pacienta, nejčastěji kultivovaných fibroblastů, s buněčnými liniemi od pacientů se známými peroxisomálními poruchami. V kultuře vzniklých multinukleárních buněk se zkoumá, zda došlo k úpravě metabolického defektu. Pokud k úpravě nedošlo, mají fibroblasty vyšetřovaného pacienta stejnou poruchu jako linie buněk od osoby se známým onemocněním.

Následovalo molekulárně genetické vyšetření, které prokázalo, že chlapec je v genu *PEX1* složený heterozygot pro dvě patogenní mutace (c.[2071+1G>T]; [2097dupT]; p.[*mis-splicing*]; [Ile700Tyrfs*42]). Oba rodiče jsou zdraví přenašeči. Rodičům bylo nabídnuto genetické poradenství a eventuální prenatální diagnostika. Po dvou letech se jim narodil zdravý chlapec.

Teoretická část

Etiologie

Peroxisomy se vyskytují v cytoplazmě prakticky všech savčích buněk, kromě erytrocytů. Svým metabolickým aparátem s více než 50 enzymy se podílejí na β-oxidaci mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCFA = mastné kyseliny s délkou řetězce uhlíků nad C22), mezi které patří například kyselina hexakosanová (C26). Peroxisomy se podílejí i na metabolismu mastných kyselin s lichým počtem uhlíků a na metabolismu rozvětvených mastných kyselin (tzv. α-oxidace; například metabolismus kyseliny trihydroxycholestanové a pristanové, která vzniká z kyseliny fytanové obsažené ve stravě). Peroxisomy se uplatňují při syntéze éterových fosfolipidů (plazmalogenů a destičkového aktivujícího faktoru [PAF]), syntéze cholesterolu, isoprenoidů (například prekurzorů žlučových kyselin) a dokosahexaenové kyseliny (C22:6) z kyseliny linolenové. Peroxisomy se podílejí na detoxikaci glykolátu na glycin (akumulace glykolátu vede ve tkáních k precipitaci kalciumoxalátu), dále se uplatňují při oxidaci kyseliny L-pipekolové a při detoxikaci peroxidu vodíku.

Peroxisomální poruchy je možno rozdělit na poruchy peroxisomální biogeneze (PBD) s postižením všech peroxisomálních funkcí, na izolované poruchy jednotlivých peroxisomálních enzymů a na poruchy transportu přes peroxisomální membránu. Zellwegerův syndrom (ZS) nebo také hepatocerebrální syndrom je nejzávažnější formou spektra PBD, jež dále zahrnuje neonatální adrenoleukodystrofii, infantilní Refsumovu nemoc a rhizomelickou *chondrodysplasia punctata* (dohromady jde o tzv. Zellwegerovo spektrum). Příčinou peroxisomálních onemocnění ve skupině PBD jsou mutace v některém z genů *PEX* kódujících peroxiny, což jsou proteiny nezbytné pro správnou peroxisomální biogenezi i pro zabudování peroxisomálních enzymů do tvořící se *matrix* peroxisomu.

Patologické hromadění nezpracovaných VLCFA vede ke strukturálnímu a funkčnímu poškození buněčných membrán. Nadbytek VLCFA v mozku způsobuje demyelinizaci s indukovanou zánětlivou odpovědí bílé hmoty až charakteru autoimunitního zánětu. Dochází k perivaskulární infiltraci T- i B-lymfocyty a makrofágy a zvyšují se rovněž hladiny některých leukotrienů. Dále dochází k poruchám migrace neuronů, nejspíš proto, že VLCFA jsou součástí gangliosidů a buněčných adhezivních struktur. K postižení CNS přispívá i chybění plazmalogenů, které jsou esenciální součástí buněčných membrán a myelinu. Navíc deficit PAF negativně ovlivňuje glutaminergní transmisi.

Kyselina pipekolová vzniká nejspíše ve střevním *lumen* při katabolismu aminokyseliny lysinu činností střevních bakterií. V tělních tekutinách se hromadí nejen u pacientů s peroxisomálním onemocněním, ale i u osob s chronickým jaterním onemocněním a nemocných s pyridoxin-dependentními křečemi (antiquitinový [ATQ] deficit; ATQ funguje jako aldehyddehydrogenáza ALDH7A1 důležitá v metabolismu lysinu).

Klinické projevy

U dětí s Zellwegerovým syndromem se symptomy projevují hned po narození. Charakteristická je kraniofaciální dysmorfie, extrémní hypotonie *(floppy infant)*, porucha pití, postižení jater, časté křeče a kostní abnormity *(viz tab. 7.1.2)*. Incidence ZS se udává mezi 1 : 50 000 a 1 : 100 000. Děti s ZS mají vysoké čelo, hypoplastické supraorbitální oblouky, epikanty, hypoplazii středové části obličeje a široce zející velkou fontanelu. Spontánní motorika chybí a reflexy nejsou výbavné.

Zellwegerův syndrom je multisystémové onemocnění. Mezi oční projevy patří zákal rohovky *(corneal clouding)*, katarakta, glaukom, atrofie optiku, sítnice se šedými disky a pigmentová retinopatie, patologická odpověď při vyšetření elektroretinogramu i při vyšetření zrakových evokovaných potenciálů (VEP). Játra jsou zvětšená a v ledvinách bývají přítomné cystické změny.

Při rtg vyšetření v novorozeneckém a kojeneckém věku bývají na epifýzách vidět tečkovité kalcifikace *(calcific stippling)*, nejčastěji na snímku patelly a/nebo paty, ale „tečkování" obvykle mizí v batolecím věku. Zobrazení CNS pomocí MRI ukáže poruchy gyrifikace a neuronální migrace s projevy polymikrogyrie, pachygyrie, lissencefalie či heterotopie v mozečku. U třetiny dětí se rozvine adrenální insuficience.

Prognóza dětí s ZS je krajně nepříznivá, většina umírá v kojeneckém, nejpozději v batolecím věku. Nejčastějšími příčinami úmrtí jsou respirační selhání nebo infekční komplikace. U dětí v batolecím věku se doporučuje vyšetřit oxalurii pro riziko nefrolitiázy a ledvinného selhání. Příčinou úmrtí může být i adrenální insuficience. V autoptickém nálezu z dřeně nadledvin jsou přítomné cytoplazmatické lamelární inkluze cholesterolu esterifikovaného mastnými kyselinami s velmi dlouhým řetězcem.

Tab. 7.1.2 Klinická manifestace v souboru 19 dětí s poruchou biogeneze peroxisomů
(upraveno dle: Roscher et al., 1989)

Příznak		Výskyt (%)
Dysmorfie	• široká fontanela	91
	• vysoké čelo	86
	• široký kořen nosu	83
	• epikanty	70
	• mikrognacie	56
	• deformita boltců	50
	• klenuté patro	45
Oči	• degenerace sítnice	100
	• atrofie očního nervu	60
	• katarakta	14
	• zákal rohovky	11
Nystagmus		88
Hepatomegalie		85
Křeče		73
Cysty ledvin		67
Kryptorchismus		60
Polymikrogyrie		60
Tečkovité kalcifikace		38

Neonatální adrenoleukodystrofie a infantilní Refsumova nemoc se manifestují v novorozeneckém či kojeneckém věku příznaky, které se podobají projevům u dětí s ZS, ale průběh onemocnění může být i poněkud mírnější. Část postižených dětí se dokonce naučí chodit, nicméně mentální vývoj je obvykle zastaven, mohou být přítomné křeče, leukodystrofie, hepatopatie, renální cysty i tečkování kostí na rtg snímku epifýz.

Rhizomelická *chondrodysplasia punctata* se projevuje proximálním (rhizomelickým) zkrácením dlouhých kostí s pohárkovitým rozšířením metafýz (*metaphyseal flaring*, zejména na humeru), rozštěpy obratlových těl, hypoplastickými křídly pánevních kostí (*iliac hypoplasia*) a generalizovaným tečkováním v oblasti epifýz (*chondrodysplasia punctata*). Postižené děti mají klenuté čelo, vpáčený kořen nosu, oboustrannou kataraktu, poruchu růstu a těžké kontraktury. Časté je postižení kůže charakteru ichtyózy. Psychomotorický vývoj je opožděný. Zobrazení CNS může ukázat atrofii mozku a mozečku, poruchu myelinizace, poruchy migrace neuronů a patologické změny v bílé hmotě.

Diagnostika
Diagnostika peroxisomálních poruch v novorozeneckém věku je založena na klinickém podezření, které je podpořeno nálezem patologického profilu VLCFA v krvi. Diagnózu peroxisomálního onemocnění na biochemické úrovni potvrzuje vysoká hladina kyseliny hexakosanové (C26:0), tetrakosanové (C24:0) a zvýšený poměr těchto kyselin ke kyselině dokosanové (C22:0) (první číslo udává počet uhlíků v kyselině, druhé číslo pak počet nenasycených vazeb).

K upřesnění nálezu poslouží i vyšetření plazmalogenů v erytrocytech, které je na našem pracovišti rovněž k dispozici. Vyšetření konkrétního genu lze blíže zacílit po enzymatickém vyšetření a komplementační studii v kultuře kultivovaných fibroblastů.

Léčba
Kauzální terapie neexistuje. Žádná dosud zkoušená metoda léčby včetně různých dietních opatření (mj. omezení VLCFA nebo kyseliny fytanové ve výživě) neovlivnila krajně nepříznivou prognózu a nevedla ke zlepšení vývoje. Těžká hypotonie s poruchou polykání vyžaduje sondování a/nebo zavedení výživové gastrostomie. Dítě může dostávat odstříkané mateřské mléko nebo umělou mléčnou výživu, ale u části dětských pacientů je nutná elementární strava pro potíže se vstřebáváním tuků při nedostatečné syntéze prekurzorů žlučových kyselin v peroxisomech. Cholestáza může být zmírněna podáváním kyseliny ursodeoxycholové.

Literatura:

1. Berendse K et al.: High prevalence of primary adrenal insufficiency in Zellweger spectrum disorders. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 133.
2. Ebberink MS et al.: Genetic classification and mutational spectrum of more than 600 patients with a Zellweger syndrome spectrum disorder. *Hum Mutat* 2011; 32(1): 59–69.
3. Roscher AA et al.: Genetic and phenotypic heterogeneity in disorders of peroxisome biogenesis – a complementation study involving cell lines from 19 patients. *Pediatr Res* 1989; 26(1): 67–72.
4. Steinberg SJ et al.: Peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 1733–1748.

7.2 X-vázaná adrenoleukodystrofie

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika
Chlapec se narodil z první fyziologické gravidity s porodní hmotností 3350 g a délkou 50 cm, poporodní adaptace probíhala bez komplikací. Psychomotorický vývoj odpovídal věku až do 6 let, kdy prodělal akutní horečnatý infekt, při němž si začal stěžovat na slabost dolních končetin, pro kterou nemohl vylézt na palandu. Po odeznění infektu se stav upravil, ale krátce poté, při výletu na kole ve známém prostředí, byl náhle dezorientován a nestabilní. Matka si všimla, že chlapec občas mívá pohled „někam do dáli“, on sám si začal stěžovat, že vidí rozmazaně až dvojitě. Měl nejistou chůzi s občasným zavrávoráním, tituboval ve stoji se zavřenýma očima a taxe ruka/nos byla nepřesná. V 7 letech měl normální výšku na 70. percentilu, hmotnost na 22. percentilu a obvod hlavy na 55. percentilu. Neurologické vyšetření potvrdilo paleo- i neocerebelární symptomatologii.

Laboratorní vyšetření (krevní obraz, biochemie) byly v normě, pouze hladina ranního kortisolu byla na dolní hranici normy (127 nmol/l, norma 118–618) a koncentrace ACTH při horní hranici normy (57 ng/l, norma 10–60). ACTH test ukázal ještě dostatečnou stresovou odpověď kůry nadledvin se vzestupem hladin kortisolu na 593 a 670 nmol/l.

Těžce patologický byl nález při vyšetření MRI, které ukázalo symetrická ložiska demyelinizační léze v parietookcipitální oblasti mozku charakteristické pro cerebrální formu X-vázané adrenoleukodystrofie (X-ALD) (*viz obr. 7.2.1*). Loesovo skóre (hodnocení leukodystrofických změn podle stupně závažnosti) dosáhlo 6 bodů (norma 0, mírné změny 1–2, středně závažné změny 3–4, závažné změny 5–10). V likvoru byla zjištěna

psychosin. Akumulace galaktocerebrosidu aktivuje tvorbu mnohojaderných makrofágů neboli globoidních buněk s mírně elektrodenzními a PAS-pozitivními inkluzemi.

Galaktosylsfingosin se akumuluje dominantně v oligodendrogliích a ve Schwannových buňkách. Postižen je centrální i periferní nervový systém. Onemocnění se na začátku projeví encefalopatií, dále dochází k masivní ztrátě myelinu a oligodendroglie. Proces vyvolává zánětlivou odpověď s aktivací makrofágů a mikroglie, zejména s infiltrací kolem krevních cév v místech ztráty myelinizace s tvorbou astrocytárních glióz. Přímá toxicita psychosinu ovlivňuje rychlý axonální transport aktivací axonálních fosfotransferáz s následnou abnormní fosforylací lehkých řetězců kinesinu. Psychosin také patologicky ovlivňuje integritu buněčných membrán.

Klinické projevy

Na základě nástupu onemocnění se tradičně klasifikují čtyři formy onemocnění:

1. časně infantilní forma se začátkem mezi 3. a 6. měsícem věku, charakterizovaná iritabilitou, opožděním vývoje, ztrátou zraku, hypertonií a decerebrační rigiditou;
2. pozdně infantilní forma s nástupem ve druhé polovině kojeneckého věku;
3. juvenilní forma s nástupem mezi 1. a 10. rokem věku charakterizovaná spastickou tetraparézou, ataxií, atrofií *nn. optici*, opožděním a regresem ve vývoji;
4. adultní (nejméně častá) forma s projevy spastické paraparézy a mozečkové symptomatologie.

Časně infantilní forma je nejčastější (80 %). Po prvotním 3–6 měsíců trvajícím bezpříznakovém období se onemocnění projeví dráždivostí, pláčem, ztuhlostí končetin nebo horečkami neznámého původu (*viz tab. 8.2.1*). Nápadná je zvýšená senzitivita vůči vnějším podnětům (zvukovým, vizuálním, ale i taktilní hyperestezie). V dalším průběhu dochází ke klinickému zhoršení s celkovou neurodegenerací, často se vyskytují epileptické záchvaty, myoklonie, atrofie optiku a opožděna fotoreakce. Onemocnění rychle progreduje do výrazné kvadruspasticity. Charakteristickým příznakem jsou extendované a překřížené dolní končetiny, flexe horních končetin a záklon hlavy. V poslední fázi onemocnění je dítě slepé a hluché, s decerebrační posturou a ztrátou záměrných pohybů v důsledku postižení pyramidové dráhy a progresivní periferní polyneuropatie. Výživa je možná pouze pomocí sondy nebo PEG. Nemocné dítě umírá většinou do 2 let.

Tab. 8.2.1 **Nejčastější příznaky při nástupu časně infantilní formy Krabbeho nemoci**
(dle: Duffner et al., 2009)

Dráždivost	90 %
Ztuhlost	27 %
Špatné pití	27 %
Neudrží hlavičku	25 %
Křeče	23 %
Ruce zavřené v pěstičky	18 %
Ztráta úsměvu	15 %

Průběh u později se manifestujících forem je mnohem variabilnější. U pozdně kojenecké formy se onemocnění projeví regresem vývoje, dráždivostí, hypertonií, ataxií a poruchou zraku. Úmrtí nastává do 2–4 let od nástupu. U juvenilní formy bývá kromě regresu ve vývoji častá ztráta zraku, hemiparéza a ataxie. U všech pacientů s adultní formou se rozvíjí spastická paraparéza nebo tetraparéza. U většiny nemocných je přítomná periferní polyneuropatie, zejména demyelinizační. Méně časté příznaky zahrnují dysartrii, ataxii, *pes cavus*, atrofii jazyka či atrofii optiku. Pokles kognitivních funkcí byl u této formy pozorován pouze u 12 % pacientů. Zatímco onemocnění zůstává u některých pacientů po dlouhou dobu stabilní, u dalších je zaznamenána trvalá progrese do vegetativního stavu a smrti.

Diagnostika

V základním laboratorním vyšetření nejsou u pacientů s Krabbeho nemocí žádné specifické nálezy. Důležité je vyšetření mozkomíšního moku s nálezem vyšší hladiny proteinu (u 92 % pacientů s infantilní formou, u 50 % pacientů s pozdější manifestací). Elektromyografické vyšetření může prokázat periferní demyelinizační polyneuropatii. Tyto změny mohou klinické manifestaci i předcházet, naopak u pacientů s pozdější manifestací bývá EMG v normě. EEG vyšetření a zrakové i sluchové evokované potenciály mohou dokumentovat nespecifické abnormity.

Vyšetření mozku pomocí MRI ukáže přítomnost hypointenzních proužků periventrikulárně (nahromadění globoidních buněk s depozity lipidu) v hyperintenzní bílé hmotě při T2-váženém obrazu (*viz obr. 8.2.1A*) s relativním zachováním subkortikálních U-vláken. Pruhy perivaskulárně orientovaných hyperintenzit (v T2-vážených obrazech) v rámci změn v bílé hmotě se kromě Krabbeho nemoci vyskytují i u metachromatické leukodystrofie a gangliosidózy GM_1. Přítomné je rovněž postižení pyramidové dráhy a zadní části *corpus callosum*, u dětí s infantilní formou i změny v mozečku a mozkovém kmeni, jež mohou předcházet supratentoriálním nálezům. U dospělých pacientů je časté postižení kortikospinálních drah (94 %), hyperintenzity v průběhu *nn. optici* (89 %) a hyperintenzity či atrofie zadní části *corpus callosum* (60 %). MRI spektroskopie může prokázat vyšší hladinu cholinu, snížený *N*-acetylaspartát a glutamát.

Diagnóza na biochemické úrovni je stanovena enzymatickým vyšetřením v izolovaných leukocytech, kultivovaných fibroblastech nebo v rámci prenatální diagnostiky v kultivovaných choriocytech či amniocytech. Diagnózu lze potvrdit i na molekulárně genetické úrovni. Měření hladin psychosinu se může použít jako marker progrese onemocnění.

Léčba

V presymptomatické fázi časných forem onemocnění lze uvažovat o transplantaci hematopoetických kmenových buněk. U některých dětí došlo zachování kognitivních funkcí, zatímco jiné trpěly i přes provedenou transplantaci závažným neurologickým deficitem. Zatím výzkumně na zvířecích modelech se zkouší genová terapie, substrát redukující léčba, využití chaperonů a enzymová substituční terapie.

Literatura:

1. Cantuti Castelvetri L et al.: The sphingolipid psychosine inhibits fast axonal transport in Krabbe disease by activation of GSK3β and deregulation of molecular motors. *J Neurosci* 2013; 33: 10048–10056.
2. Duffner PK et al.: The Hunter's Hope Krabbe family database. *Pediatr Neurol* 2009; 40(1): 13–18.
3. Galbiati F et al.: Combined hematopoietic and lentiviral gene-transfer therapies in newborn Twitcher mice reveal contemporaneous neurodegeneration and demyelination in Krabbe disease. *J Neurosci Res* 2009; 87: 1748–1759.
4. Liao P et al.: Phenotypic variability of Krabbe disease across the lifespan. *J Neurol Sci* 2014; 41: 5–12.

5. Loes DJ et al.: Globoid cell leukodystrophy: distinguishing early-onset from late-onset disease using a brain MR imaging scoring method. *Am J Neuroradiol* 1999; 20(2): 316–323.
6. Suzuki K, Suzuki Y: Globoid cell leucodystrophy (Krabbe's disease): deficiency of galactocerebroside beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1970; 66: 302–309.
7. Suzuki K: Twenty five years of the "psychosine hypothesis": a personal perspective of its history and present status. *Neurochem Res* 1998; 23: 251–259.

8.3. Metachromatická leukodystrofie

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Chlapec se narodil z první fyziologické gravidity s dobrou poporodní adaptací. Porodní hmotnost činila 3500 g, délka 50 cm. Rodinná i osobní anamnéza byly bez nápadností. Vstup do školy chlapec zvládl bez potíží, učil se dobře. Ve věku 9,5 roku, ve třetí třídě, se však zhoršilo jeho soustředění, začal vynechávat písmenka, háčky a čárky. Na základě konzultace v pedagogicko-psychologické poradně, kde byly potíže se psaním a pozorností objektivizovány, bylo doporučeno podrobnější klinické vyšetření.

Podle neurologického vyšetření měl chlapec kromě vadného držení těla jen trochu horší koordinaci jemné i hrubé motorky. Psycholog popisoval milého, sociabilního, hovorného chlapce, který dobře navazoval kontakt. Aktuální úroveň kognitivních schopností byla nerovnoměrná, s podprůměrnou verbální složkou a s koncentrací pozornosti na dolní hranici pásma podprůměru. Byla konstatována zhoršená výbavnost a dysfatické obtíže. Úroveň čtení odpovídala věku, písmo bylo dysortografické.

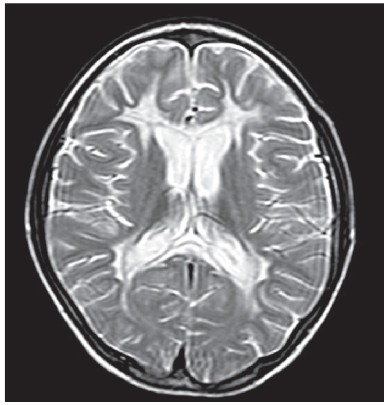
Oční pozadí bylo bez patologického nálezu. EEG dokumentovalo hrubě abnormní záznam pro intermitentní pomalou abnormitu nad zadním kvadrantem bilaterálně. Rovněž elektromyografické vyšetření bylo hrubě patologické, se zpomalenou rychlostí motorického i senzitivního vedení svědčící pro lézi periferního myelinu. Biochemické vyšetření likvoru bylo v pořádku, bez průkazu hyperproteinorachie. V rámci screeningových metabolických testů bylo provedeno vyšetření sulfatidurie v moči, které bylo pozitivní. Enzymatické vyšetření arylsulfatázy A (ASA) v leukocytech ukázalo významně sníženou aktivitu ASA (1,16 nmol/mg proteinu/15 hod, kontroly 75–79) a potvrdilo diagnózu metachromatické leukodystrofie (MLD).

Na kliniku byl chlapec přijat ve věku 10,5 roku *(viz obr. 8.3.1A)* s výškou 146 cm (55. percentil), hmotností 43,5 kg (87. percentil) a obvodem hlavy 53 cm (35. percentil). Při neurologickém vyšetření byl nesoustředěný, měl zabíhavé nepřesné odpovědi až charakteru fabulací. MRI mozku ukázalo výraznou leukodystrofii *(viz obr. 8.3.2)*. Genetické vyšetření provedené v zahraničí potvrdilo diagnózu MLD na molekulárně genetické úrovni, chlapec je v genu *ARSA* složený heterozygot pro patogenní mutace c.459+1G>A (chybný sestřih) a c.536T>G; p.Ile179Ser.

Vzhledem k dobrému celkovému hodnocení v psychologickém vyšetření byla i přes výrazné změny v bílé hmotě a nálezu polyneuropatie při EMG po vzájemné dohodě s rodiči indikována a provedena transplantace hematopoetických kmenových buněk ve snaze zastavit progresi onemocnění. Transplantace od nepříbuzného dárce proběhla v necelých 11 letech věku. Průběh byl komplikován poruchou vědomí s křečemi a hypertenzí. I když byla transplantace hematologicky úspěšná, bohužel došlo k postupné progresi neurologických příznaků onemocnění.

Chlapci je nyní 19 let, trpí spastickou diparézou, paleocerebelárním syndromem a těžkou mentální retardací *(viz obr. 8.3.1B)* na úrovni cca 3 let. Sleduje televizi a chodí na zahradu, v chování jsou přítomné stereotypie. Dorozumění je obtížné, má echolalii, odpovědi jsou adekvátní pouze zřídka. Ve věku 16 let se objevily projevy agresivity, které ustoupily díky léčbě tiapridem.

Obr. 8.3.1 **10,5letý chlapec s juvenilní formou metachromatické leukodystrofie v době stanovení diagnózy; psychologické vyšetření s úrovní intelektových schopností odpovídají podprůměru (A). Chlapec ve věku 18,5 roku, 7 let po transplantaci hematopoetických kmenových buněk, s intelektovou schopností odpovídající pásmu těžké mentální retardace (mentální věk cca 3 roky; grafický projev odpovídá věku 4 let) (B).**



Obr. 8.3.2 **MRI CNS (T2-vážený obraz) u 10,5letého chlapce s juvenilní formou metachromatické leukodystrofie v podobě periventrikulárních splývajících demyelinizačních ložisek ve tvaru motýlích křídel (s propagací frontálně a okcipitálně).**
(S laskavostí poskytlo radiodiagnostické oddělení Thomayerovy nemocnice v Praze.)

Teoretická část

Etiologie

Metachromatická leukodystrofie (MLD) je způsobena poruchou degradace sulfoglykolipidů, zejména galakto- a laktosylcerebrosidsulfátu, obsahujících 3-O-sulfogalaktózu. Odštěpení sulfátové skupiny je katalyzováno enzymem arylsulfatázou A (ASA), který k reakci vyžaduje protein saposin B. Deficit obou těchto proteinů způsobuje MLD, avšak deficit ASA je mnohem častější.

Uvedený typ glykolipidů tvoří kolem 4–5 % lipidů myelinu a spolu s galaktosylceramidem je tak hlavní glykosfingolipidovou složkou myelinu neuronů centrálního i periferního nervového systému. Střádáním lipidu dochází ke ztrátě oligodendroglií a Schwannových buněk s progresivní demyelinizací, s klinickým korelátem dominantně neurologického postižení.

Deficit ASA je děděn autosomálně recesivně, příslušný gen *ARSA* se nachází na 22q13.33. Výskyt se v ČR odhaduje na 1 : 150 000.

Klinický obraz

Deficit ASA je charakterizován třemi klinickými formami: pozdně infantilní (50–60 % případů), juvenilní (20–30 % případů) a adultní (15–20 % případů). Věk nástupu koreluje i s progresí onemocnění, v trvání od 3 do 10 let u pozdně infantilní formy až po více než 20 let u juvenilní a adultní formy. Postižení členové jedné rodiny se většinou vyznačují podobným průběhem onemocnění.

Pozdně infantilní forma MLD se projevuje ve věku kolem 1–2 let. Typickými příznaky jsou svalová slabost, opakované pády a neobratnost, dyspraxie, chůze po špičkách, smazaná řeč nebo epileptické záchvaty. Dochází k regresu vývoje a ztrátě řeči. Ataxie a paréza vedou ke ztrátě samostatné chůze, děti potřebují invalidní vozík. Později se rozvíjí spasticita, bolesti končetin, periferní polyneuropatie, porucha zraku při atrofii zrakových nervů a porucha sluchu. V terminálním stadiu je přítomen vegetativní stav s decerebrační posturou a tonickými spasmy končetin. Průměrný věk při úmrtí v případě pozdně infantilní formy je 4,2 roku.

Juvenilní forma MLD nastupuje mezi 3 a 16 lety věku. Postižení u našeho chlapce odpovídá této formě onemocnění. Až 66 % dětí se manifestuje poruchou pozornosti a potížemi ve škole, 26 % poruchou chůze, 18 % tremorem či ataxií, 13 % polyneuropatií a 5 % epileptickými záchvaty. Může se vyskytnout inkontinence a problematické nebo bizarní chování. Průměrný věk při úmrtí je 17,4 roku.

Adultní forma MLD se manifestuje po dosažení sexuální zralosti, jsou však popsány i kazuistiky s nástupem ve 4. či 5. dekádě života. Onemocnění se projeví problémy ve škole nebo práci, změnou osobnosti, závislostí na alkoholu či drogách, emoční labilitou. Dominantní jsou neurologické a psychiatrické příznaky. Až polovina pacientů mezi 10 a 30 lety má psychotické symptomy zahrnující sluchové halucinace, bludy, formální poruchy myšlení a katatonii. Ty často předcházejí křečím, choree či dystonii. Neurologické příznaky pak zahrnují především slabost a ztrátu koordinace progredující do spasticity, inkontinence a epilepsie. Častá je periferní polyneuropatie. Progrese onemocnění je variabilní, s fázemi relativního klidu a zhoršování. Terminální stadium je podobné předešlým formám.

Diagnostika

Na MLD je nutno myslet u pacientů s progresivním neurologickým postižením a difuzní demyelinizací a nebo u psychiatrických příznaků dospělých. Základní biochemické vyšetření je bez nápadností, ale vyšetření mozkomíšního moku může prokázat proteinocytologickou disociaci. Pro MRI vyšetření jsou charakteristické změny se zvýšeným signálem v T2-váženém obrazu v podobě periventrikulárních splývajících demyelinizačních ložisek ve tvaru motýlích křídel (s propagací frontálně a okcipitálně).

Vzhledem k akumulaci sulfatidů v epitelu buněk distálního tubulu ledvin lze sulfatidy v moči zachytit metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Sulfatidy též silně reagují s některými pozitivně nabitými barvivy (např. kresylvioleť) za vzniku barevného posunu, tzv. metachromazie. Na principu uvedeného fenoménu funguje screeningová metoda detekce tzv. metachromatických substancí v moči.

Potvrzení diagnózy na biochemické úrovni lze provést vyšetřením aktivity ASA v izolovaných leukocytech. Vzhledem k tomu, že nízká aktivita ASA může být také důsledkem klinicky němé pseudodeficience enzymu (1–2 % Evropanů má kvůli homozygotní variantě *pd* (pseudodeficit) v genu *ARSA* reziduální aktivitu ASA pouze 5–15 %, avšak bez jakéhokoli dopadu na zdraví), je nutno diagnózu potvrdit i detekcí sulfatidů v moči nebo molekulárně genetickým vyšetřením.

Léčba

V léčbě MLD se využívá transplantace hematopoetických buněk (HSCT), kdy monocyty z kostní dřeně dokáží přejít přes hematoencefalickou bariéru a diferencovat se v mikroglii, jež je schopna transportovat enzym do oligodendrocytů a neuronů. Vzhledem k rizikům, která s sebou tato léčba přináší, a nejistému dlouhodobému efektu se stále jedná o metodu kontroverzní. Zásadní je HSCT provést ještě před nástupem klinických příznaků.

Ani časně provedená HSCT však nemá žádný efekt u pozdně infantilní formy, kde je dostupná pouze symptomatická terapie. U pozdních forem onemocnění může HSCT stabilizovat demyelinizaci CNS a zastavit či zpomalit progresi onemocnění. Terapie nemá vliv na periferní nervstvo. HSCT rovněž nemá žádný efekt na MLD způsobenou deficitem saposinu B. Při indikaci HSCT je nutno počítat i s tím, že efekt na stabilizaci demyelinizace v CNS se dostaví většinou až po 12–18 měsících od transplantace.

V poslední době se pacientům zkouší aplikovat intratekálně rekombinantní enzym ASA v pravidelných intervalech, ale výsledky studií zatím nebyly publikovány.

Důležitá je symptomatická a podpůrná terapie antiepileptiky, svalovými relaxancii a rehabilitace. Potíže s příjmem potravy si mohou vyžádat zavedení výživové gastrostomie. Důležitá je psychická podpora pacienta a rodiny.

Literatura:

1. Boucher AA et al.: Long-term outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for metachromatic leukodystrophy: the largest single-institution cohort report. *Orphanet J Rare Dis* 2015; 10: 94.
2. Gieselmann V et al.: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. *Acta Paediatr Suppl* 2003; 92(443): 74–79.
3. Groeschel S et al.: Metachromatic leukodystrophy: natural course of cerebral MRI changes in relation to clinical course. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 1095–1102.
4. Kulhánek J a kol.: Psychiatrická manifestace dědičných metabolických poruch. *Česká a slovenská psychiatrie* 2015; 111(6): 295–305.
5. Mahmood A et al.: Metachromatic leukodystrophy: a case of triplets with the late infantile variant and a systematic review of the literature. *J Child Neurol* 2010; 25(5): 572–580.
6. van Rappard DF et al.: Metachromatic leukodystrophy: disease spectrum and approaches for treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29(2): 261–273.

8.4 Niemannova-Pickova nemoc typu A/B

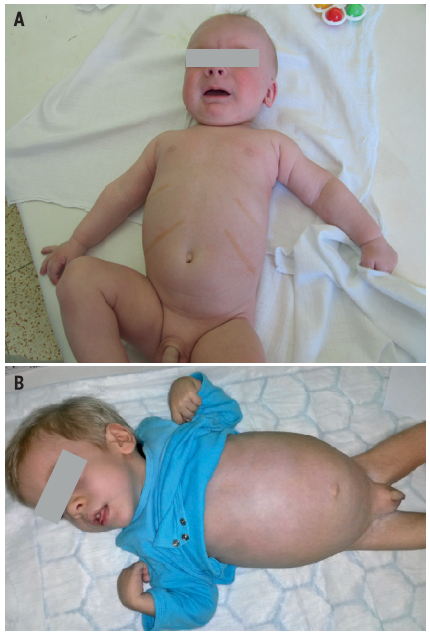
Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Při preventivní prohlídce chlapce s dobrou poporodní adaptací a normálním vývojem v prvních týdnech života byla ve věku 3 měsíců pozorována mírná hypotonie, pro kterou byla doporučena rehabilitace. V 5 měsících věku byla zachycena hepatomegalie (játra 3 cm pod oblouk) a také slezina byla hmatná pod žeberním obloukem. Opakovaná biochemická vyšetření ukázala zvýšené hladiny ALT (5,6–9,4 μkat/l, norma ≤ 0,6) a AST (6,9–11,9 μkat/l, norma ≤ 0,6) bez elevace obstrukčních enzymů, zvýšenou hladinu cholesterolu (6,1–5,9 mmol/l, norma 2,6–4,8) se sníženou frakcí HDL cholesterolu (0,55 mmol/l, norma >1) a hypertriacylglycerolemii (4,8–5,5 mmol/l, norma 1–1,64). Hladiny amoniaku, α-1-antitrypsinu a ceruloplasminu byly v normě. Sérologické vyšetření hepatitid, EBV, CMV a toxoplazmózy bylo negativní. Sonografické vyšetření potvrdilo hepatomegalii a mírnou splenomegalii. V rámci diferenciálně diagnostické rozvahy bylo doporučeno metabolické vyšetření, jež ukázalo významně zvýšenou aktivitu kyselé fosfatázy (169 nkat/l, norma ≤ 108) a vysokou aktivitu chitotriosidázy (1954 nmol/ml/hod, norma 4,4–89) a podpořilo podezření na dědičnou poruchu metabolismu s lysosomálním střádáním.

Chlapec byl při přijetí na naše pracoviště 6měsíční, antropometrická data byla v normě (délka 69 cm, hmotnost 7120 g, obvod hlavy 43 cm). Chlapec měl hezký sociální kontakt, přetáčel se, ale hůře se přitahoval do sedu. V pronační poloze bylo patrné nedokonalé držení těla s reklinací hlavičky, anteflexí pánve a abdukcí dolních končetin. Nápadné byly hrubší rysy obličeje, výrazná hepatomegalie (+7 cm pod žeberní oblouk) i splenomegalie (+6 cm) (*viz obr. 8.4.1A*). Vyšetření očního pozadí ukázalo světlou šedobělavou makulu s červeně svítící foveou, tedy obraz třešňové skvrny v centrální krajině. Diagnóza Niemannovy-Pickovy nemoci A/B byla na biochemické úrovni potvrzena stanovením snížené aktivity kyselé sfingomyelinázy 0,7 nmol/mg/hod (kontroly 2,3–11,7). Tato reziduální aktivita odpovídala spíše intermediárnímu fenotypu s rychlou progresí. Molekulárně genetické vyšetření prokázalo, že chlapec je složený heterozygot pro mutace c.[1355T>C]; [1785_1786delTT]; p.[Leu452Pro]; [Ala597Profs*6] v genu *SMPD1*. Oba rodiče jsou zdraví heterozygoti.

Psychomotorický vývoj chlapce postupně regredoval. Ve věku 2 let byl výrazně kachektický s nápadně zvětšeným břiškem. Délka činila 80 cm (0,9. percentil), hmotnost 9 kg (1,9. percentil vzhledem k délce) a obvod hlavičky 47 cm (6,8. percentil). Játra dosahovala +10 cm pod pupek, slezina byla +12 cm pod žeberním obloukem (*viz obr. 8.4.1B*). Chlapec byl bez zrakového kontaktu, měl smíšený centrální hypotonický syndrom s areflexií a známkami akrální spasticity na dolních končetinách, motorický i sociální vývoj odpovídal úrovni patologického novorozence.



Obr. 8.4.1 **Kraniofaciální dysmorfie a významná hepatosplenomegalie u 6měsíčního chlapce s Niemannovou–Pickovou nemocí typu A (A). Stejný chlapec ve věku 2 let (B).**

Teoretická část

Etiologie

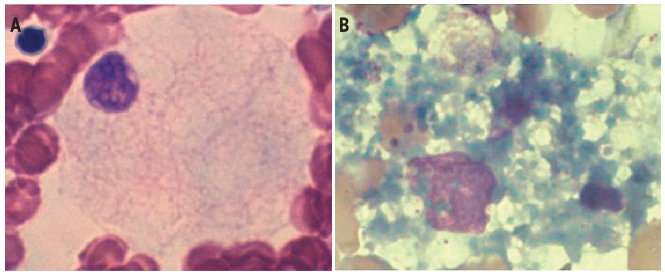
Niemannova-Pickova nemoc (NPD) typu A/B je lysosomální onemocnění způsobené deficitem kyselé sfingomyelinázy (ASM) se střádáním sfingomyelinu zejména v buňkách retikuloendotelového systému, plicních makrofázích, hepatocytech a případně i v centrálním nervovém systému a retinálních gangliových buňkách. Dědičnost onemocnění je autosomálně recesivní, výskyt v naší populaci činí 1 : 300 000.

Sfingomyelin je součástí většiny buněčných membrán, které spolu s cholesterolem stabilizují a propůjčují jim jedinečné biofyzikální vlastnosti, zejména v membránových mikrodoménách odpovědných za buněčnou signalizaci. Sfingomyelin je i hlavní fosfolipid myelinových pochev. V lysosomech je hydrolyzován ASM na fosfocholin a ceramid. Na ASM se podobně jako na jiné lysosomální enzymy naváže na *N*-oligosacharidové zbytky manóza-6-fosfát, s jehož pomocí je enzym směřován do lysosomu. ASM tvoří komplex s dalšími lipidovými hydrolázami a jejím koenzymem je zinek. V případě buněčného stresu může být translokována na vnější list plazmatické membrány (ASM může hydrolyzovat sfingomyelin i při fyziologickém pH). Rozštěpení sfingomyelinu umožní reorganizaci membránových domén, přenašečů a stimulaci buněčné signalizace. Primárním patofyziologickým mechanismem NPD je lysosomální střádání sfingomyelinu s tvorbou pěnitých makrofágů (Niemannovy-Pickovy buňky) ve slezině, játrech, plicích, kostní dřeni a mozku (*viz obr. 8.4.2*). Sekundárně je přítomná

i porucha membránového lipidového metabolismu. Kromě sfingomyelinu jsou u NPD (podobně jako u NPD typu C, avšak v menší míře) zvýšené lysosfingomyelin, cholesterol, glukocerebrosid, laktosylceramid a gangliosidy (zejména GM_3). Intracelulární porucha metabolismu cholesterolu vede ke změně lipidového profilu (HDL cholesterol je snížený, LDL cholesterol zvýšený a zvýšená je i hladina TAG).

Při hydrolýze sfingomyelinu vznikají degradační produkty (ceramid, sfingosin a sfingosin-1-fosfát), které jsou důležitými signálními molekulami. Hladina ceramidu je u NPD překvapivě spíše zvýšená, pravděpodobně zvýšenou hydrolýzou sfingomyelinu neutrální a alkalickou sfingomyelinázou v nelysosomálních kompartmentech buňky. Na myším modelu NPD byly prokázány abnormální nervové synapse s jejich funkční poruchou.

U NPD jsou dále přítomné hematologické abnormity (trombocytopenie, leukopenie), které jsou způsobeny porušenou funkcí jater, sleziny a kostní dřeně. Porucha růstu u pacientů s NPD se vysvětluje postižením signalizační dráhy STH→IGF-1.



Obr. 8.4.2 Cytologický obraz lysosomálního střádání v makrofázích v nátěru kostní dřeně u chlapce s Niemannovou–Pickovou nemocí typu A/B:
A) pěnitá buňka *(foam cell)*;
B) makrofág s významným podílem ceroidu na lysosomálním střádání (blíží se obrazu *sea blue histiocyte*).
(S laskavostí poskytla MUDr. Helena Hůlková, Ph.D., ÚDMP 1. LF UK a VFN v Praze.)

Klinické projevy

NP-A/B je systémové onemocnění charakterizované hepatosplenomegalií, hepatopatií, neurologickým postižením, infiltrativním postižením plic, anemií, trombocytopenií a postižením skeletu. Podle závažnosti klinických příznaků se odlišuje těžká forma onemocnění (NP-A) s akutním neuronopatickým průběhem a nepříznivou prognózou, jež obvykle vedle k úmrtí dítěte do 3 let, a mírnější non-neuronopatická forma onemocnění (NP-B) s variabilním nástupem příznaků od kojeneckého věku až po dospělost, která má i lepší prognózu, zejména u pacientů s izolovanou viscerální formou. Nověji se předpokládá, že se nejedná o dvě formy jedné nemoci, hovoří se spíš o kontinuitě klinických projevů. V české a slovenské populaci převažuje intermediární typ s mírnějším neurologickým postižením, který se vyskytuje u 64 % pacientů.

U dětí s těžkou formou **NP-A** se rozvíjí významná hepatosplenomegalie během prvních 6 měsíců života *(viz obr. 8.4.1A)*, některé děti mívají i mírnou kraniofaciální dysmorfii *(viz obr. 8.4.1A)* s antevertovanými nostrilami a širším kořenem nosu. Častá je hypotonie. Počáteční vývoj může být i v normě, ale většina dětí se již nenaučí samostatně sedět, protože kolem 6. měsíce věku se psychomotorický vývoj zpomalí a v časném batolecím období dochází k rychlému regresu vývoje. Progreduje axiální a kořenová hypotonie s akrální spasticitou s vymizením šlacho-okosticových reflexů jakožto projevu smíšeného postižení centrálního a periferního nervového systému. Postižené děti ztrácejí interakci s okolím, kachektizují a vyžadují zavedení PEG.

U více než poloviny pacientů jsou postižené střádáním i retinální gangliové buňky sítnice. Relativně ušetřená a málo buněčná oblast makuly sítnice s prosvítajícími cévami kontrastuje s akumulací sfingomyelinu v okolních buňkách, což vytváří charakteristický obraz „třešňové skvrny“. Postižení retinálních gangliových buněk a myelinu vede k atrofii zrakových nervů. Nález na očním pozadí bývá přítomný již v kojeneckém věku. Intersticiální plicní postižení progreduje do respiračního selhání většinou mezi 1,5. a 3. rokem života.

NP-B se manifestuje ve kterémkoli věku, od batolecího až po pozdní dospělost. Nejčastější je hepatomegalie a především splenomegalie, jejíž objem může být až 10× větší než u zdravých osob. U postižených dětí bývá častá porucha růstu a opožděná puberta. Obvyklá je únava, bolesti kloubů, progreduje restriktivní plicní porucha a postižení srdečních chlopní. Mezi život ohrožující komplikace se řadí krvácení, ruptura sleziny, jaterní selhání (pro rozvinutou jaterní cirhózu) a respirační či kardiální selhání, které patří mezi nejčastější příčiny úmrtí.

I když je NP-B spojována s non-neuronopatickým postižením, u některých pacientů se může objevit „třešňová skvrna“ na očním pozadí a atrofie zrakových nervů. V poslední době jsou publikovány popisy pacientů s intermediárním fenotypem s mírnějším neurologickým postižením *(viz obr. 8.4.3)* zahrnujícím demyelinizační polyneuropatii, ataxii, poruchy učení, opoždění motorického vývoje a psychiatrické obtíže.

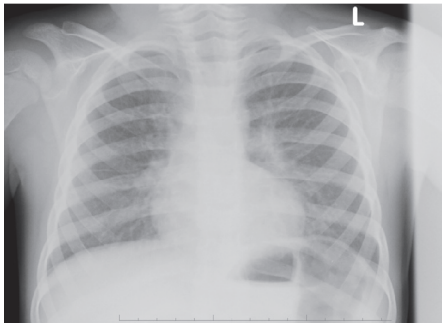
Obr. 8.4.3 3letý chlapec se středně významnou splenomegalií a mírnou hepatomegalií s intermediární formou Niemannovy-Pickovy nemoci typu A/B

Diagnostika

Tíže laboratorních nálezů může korelovat s tíží onemocnění. Jedná se o sníženou hladinu HDL cholesterolu (medián u pacientů 0,6 mmol/l, norma 1,0–1,7) se zvýšením LDL cholesterolu (medián 3,3 mmol/l), anemii a méně často trombocytopenii. U dospělých pacientů je anemie málo častá. Aktivita chitotriosidázy v plazmě (norma ≤ 89 nmol/ml/hod) je 10–100násobně zvýšená (medián 600 nmol/ml/hod), ale cca 6 % jedinců

v Evropě je homozygotních pro deleční mutaci v genu pro chitotriosidázu, proto u těchto pacientů nelze biomarker použít pro diagnostiku.

Postižení plicních funkcí je variabilní, od bezpříznakového průběhu až po respirační selhání. Rtg plic, eventuálně HRCT ukáže intersticiální proces s retikulonodulárním vzorem se zvýrazněním interlobulárních sept, stíny charakteru mléčného skla a kalcifikace objevující se na začátku v bazálních partiích, při progresi onemocnění i v horních plicních polích *(viz obr. 8.4.4)*. Difuze oxidu uhličitého je snížená. Vyšetření mozku pomocí MRI může být normální nebo ukáže korovou atrofii, atrofii mozečku, někdy hyperintenzity v T2-vážených obrazech. Třešňovou skvrnu lze prokázat fundoskopickým vyšetřením. Velikost sleziny a jater je dokumentována sonografickým vyšetřením nebo MRI břicha. Kostní věk je opožděný, častá je osteopenie se sníženým Z-skóre při denzitometrii.



Obr. 8.4.4 Intersticiální plicní proces u 3,5letého chlapce s Niemannovou-Pickovou nemocí typu A

Případné bioptické/autoptické vyšetření jater, sleziny, lymfatických uzlin, kůry nadledvin, dýchacích cest a kostní dřeně odhalí lipidy naplněné pěnité makrofágy připodobňované k moruším (Niemannovy-Pickovy buňky). Kapénky tuku jsou autofluorescentní a lze je zobrazit barvením na fosfolipidy.

Diagnóza na biochemické úrovni je stanovena měřením aktivity ASM v leukocytech nebo kultivovaných fibroblastech. Experimentálně lze ve fibroblastech doplnit zátěžový test se sfingomyelinem, kdy u typu A dojde k < 2% degradaci, zatímco u typu B až k 70–80%.

Definitivní diagnózu stanoví molekulárně genetické vyšetření genu *SMPD1*. V některých případech lze na základě mutace predikovat fenotyp. Například mutace c.1829_1831delGCC; p.Arg610del vede k non-neuronopatické formě.

Léčba

Kauzální léčba zatím není dostupná. U některých pacientů byly prováděny bronchiální laváže a splenektomie, ta však může zhoršit aterogenní lipidový profil a průběh onemocnění tak potenciálně urychlit. Transplantace hematopoetických kmenových buněk může zlepšit průběh pacientům s NP-B; na průběh závažného typu A vliv nemá. Byla ukončena I. fáze klinické studie s enzymovou substituční terapií pro dospělé pacienty trpící NP-B (preparát olipudáza alfa, rekombinantní lidská kyselá sfingomyelináza).

Literatura:

1. Hollak CE et al.: Acid sphingomyelinase (Asm) deficiency patients in The Netherlands and Belgium: disease spectrum and natural course in attenuated patients. *Mol Genet Metab* 2012; 107: 526–533.
2. Pavlů-Pereira H et al.: Acid sphingomyelinase deficiency. Phenotype variability with prevalence of intermediate phenotype in a series of twenty-five Czech and Slovak patients. A multi-approach study. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28: 203–227.
3. Schuchman EH: The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis* 2007; 30: 654–663.
4. Schuchman EH, Wasserstein MP: Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015; 29(2): 237–247.
5. Wasserstein MP et al.: Acid sphingomyelinase deficiency: prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease. *J Pediatr* 2006; 149: 554–559.
6. Wasserstein MP et al.: Successful within-patient dose escalation of olipudase alfa in acid sphingomyelinase deficiency. *Mol Genet Metab* 2015; 116: 88–97.
7. Zhang H et al.: Identification of a distinct mutation spectrum in the SMPD1 gene of Chinese patients with acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8: 15.

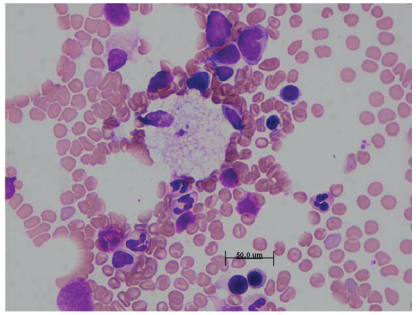
8.5 Niemannova-Pickova nemoc typu C

Pavel Ješina, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

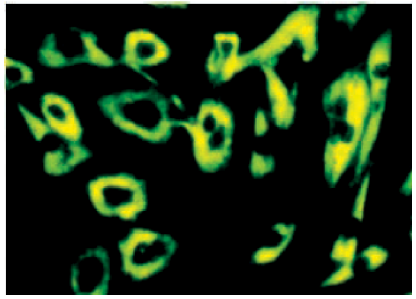
Kazuistika

Chlapec se narodil z první fyziologické gravidity v termínu s porodní hmotností 3400 g a délkou 52 cm. Poporodní adaptace byla bez komplikací, chlapec prospíval a jeho psychomotorický vývoj byl v prvních dvou letech života v normě. Ve věku 2 let prodělal několik atak nočních děsů, ale vyšetření na dětské neurologii bylo bez patologického nálezu a vyšetření na dětské psychologii dokumentovalo úroveň mentálních schopností v pásmu lehkého nadprůměru. Ve třetím roce si rodiče všimli, že chlapec má divergentní strabismus a občas koktá, proto byl doporučen na oftalmologii, foniatrii a logopedii.

Ve věku 3,5 roku spadl z kola a na pohotovosti byla zjištěna hepatomegalie (+2 cm) a splenomegalie (+4 cm). Kontrolní neurologické vyšetření ukázalo mírnou neobratnost, EEG a CT nálezy na CNS byly normální. Při diferenciálně diagnostické rozvaze nad etiopatogenezí hepatosplenomegalie bylo pomýšleno i na dědičné metabolické onemocnění se střádáním, a proto byla indikovaná punkce kostní dřeně. V nátěru byly nalezeny velké pěnité makrofágy, izotropní v polarizovaném světle, což je typický nález pro Niemannovu-Pickovu nemoc typu C (NP-C) *(viz obr. 8.5.1)*. Byla založena tkáňová kultura fibroblastů a diagnóza NP-C byla potvrzena na biochemické úrovni filipinovým testem, který prokázal patologické střádání volného cholesterolu v lysosomech *(viz obr. 8.5.2)*. Molekulárně genetická diagnostika nebyla v té době dostupná.



Obr. 8.5.1 Cytologický obraz lysosomálního střádání v makrofázích v nátěru kostní dřeně u chlapce s Niemannovou–Pickovou nemocí typu C. Makrofág s významným podílem ceroidu na lysosomálním střádání *(sea blue histiocyte)*.
(Z archivu prof. MUDr. Milana Elledera, DrSc., ÚDMP 1. LF UK a VFN v Praze.)



Obr. 8.5.2 Pozitivní filipinový test ve vzorku tkáňové kultury kožních fibroblastů pacienta s Niemannovou–Pickovou nemocí typu C, který prokázal patologickou akumulaci neesterifikovaného cholesterolu perinukleárně
(Z archivu prof. Dr. Marie T. Vanier, Lyon, Francie.)

Rodiče diagnózu plně nepřijali, doufali, že se jedná o omyl, a s chlapcem na ambulantní kontroly do metabolického centra nedocházeli. Sonografické kontroly v místě bydliště však dokumentovaly přetrvávání hepatosplenomegalie. Na prvním stupni základní školy byl chlapec neobratný, přetrvávala koktavost a manifestovaly se specifické poruchy učení (dyspraxie) a nepozornost. Na druhém stupni základní školy se objevila dysartrie. Po základní škole chlapec nastoupil na střední odborné učiliště, které zvládal s horším prospěchem.

Když bylo chlapci 16,5 roku, byla u jeho sestřenice diagnostikována Niemannova-Pickova nemoc typu C, což přivedlo rodiče k rozhodnutí objednat se do metabolické ambulance. Chlapec měl normální antropometrické parametry, vadné držení těla, hepatosplenomegalii (játra +2 cm, slezina +3 cm), dysartrii, horizontální nystagmus a mírné omezení vertikálního pohledu dolů, někdy lépe prokazatelné vestoje, jindy vsedě. Oční vyšetření ukázalo horizontální nystagmus a mírné omezení fixačních pohybů očí (hypometrie sakád). Nález na očním pozadí byl v normě. Foniatarické vyšetření zjistilo oboustrannou percepční hypakuzi (ztráta dle Fowlera 64 %). Sonografické vyšetření břišních orgánů potvrdilo středně významnou hepatomegalii (index velikosti jater 218, norma 82 ± 13) a významnou splenomegalii (volumometrie sleziny 1042, norma 74 ± 11) s homogenním parenchymem a vysokou echogenitou, což svědčilo pro významné střádání. V té době již byla dostupná molekulárně genetická diagnostika NP-C, která ukázala, že chlapec je v genu *NPC1* složený heterozygot pro dvě dříve popsané patogenní *missense* mutace c.2861C>T a c.3557C>A, které vedou k aminokyselinové záměně p.Ser954Leu a p.Arg1186His.

Psychologické vyšetření zaměřené zejména na hodnocení exekutivních funkcí (test *Frontal Assessment Battery*) potvrdilo oslabení exekutivních schopností a snížení verbální fluence související s pamětí a pozorností. Celková úroveň intelektu se pohybovala v pásmu podprůměru (CIQ = 86), při rovnoměrném rozložení složky verbální (VIQ = 89) a performační (PIQ = 85). Výsledky funkčních pohybových testů hodnotících úroveň hrubé motoriky (chůze po čáře 10 metrů, chůze 6 minut, vztyk z lehu a vystoupání 4 schodů) byly normální. Podle věku rozvoje neurologické symptomatologie bylo onemocnění pacienta hodnoceno jako juvenilní forma NP-C.

Podrobné zhodnocení funkčního stavu pacienta bylo jednou z nezbytných podmínek pro zahájení substrát redukující terapie (SRT) perorálním miglustatem. Pacient toleruje SRT velmi dobře. Sonograficky byl prokázán ústup splenomegalie do pásma střední významnosti (484, norma 74 ± 11), přetrvává střední hepatomegalie (199, norma 82 ± 13). Intelektové výkony se nadále pohybují v dolním pásmu podprůměru, exekutivní funkce jsou oslabené, ale zlepšila se výbavnost pojmů. V posledním neurologickém nálezu přetrvává vertikální pohledová obrna směrem dolů, omezení sakád všemi směry, více vertikálně. Je přítomná mírná dysartrie, dysfagie (nepravidelně při pití tekutin), lehká svalová dysbalance a bilaterální hypakuze (celková ztráta dle Fowlera činí 67,7 %). Klinický stav pacienta po 5 letech terapie miglustatem je stacionární, bez zásadní progrese.

Teoretická část

Etiologie

Niemannova-Pickova nemoc typu C (NP-C) představuje klinicky velmi heterogenní neurodegenerativní onemocnění, které se může manifestovat kdykoli od novorozeneckého věku až po pozdní dospělost. Výskyt NP-C v České republice dosahuje 1 : 93 000, což koreluje s incidencí v dalších evropských zemích, přesto je záchyt NP-C s velkou pravděpodobností podhodnocen. Dědičnost NP-C je autosomálně recesivní a onemocnění se vyskytuje panetnicky. Zatímco Niemannova-Pickova nemoc typu A/B (NP-A/B) je zapříčiněna poruchou funkce lysosomálního enzymu kyselé sfingomyelinázy, NP-C je způsobena poruchou transportu lysosomálního neesterifikovaného cholesterolu přes lysosomální membránu.

Celý patofyziologický mechanismus NP-C stále není plně objasněn. Primární příčinou nemoci je funkční porucha lysosomálního membránového proteinu NPC1 nebo solubilního lysosomálního proteinu NPC2. Oba proteiny se podílejí na transportu cholesterolu a pravděpodobně i některých dalších látek lipidové povahy z lysosomu/pozdního endosomu do endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu i na plazmatickou membránu. Porucha transportu vede k hromadění neesterifikovaného cholesterolu, ale také sfingomyelinu a některých dalších glykosfingolipidů, především gangliosidu GM_2 a GM_3, sfingosinu, sfinganinu a fosfolipidů v lysosomech.

Vedle vlastního lysosomálního střádání se však na patogenezi neurodegenerace u pacientů s NP-C podle současných poznatků podílí i porucha intracelulárních regulačních mechanismů. Nově byly u pacientů s NP-C popsány rovněž sekundární poruchy

mitochondriálního energetického metabolismu se sníženou produkcí ATP, zvýšeným oxidativním stresem a porušenou mitofagií, které jsou zřejmě způsobeny zvýšeným obsahem cholesterolu v mitochondriální membráně, ve které je za fyziologických podmínek jen velmi nízká koncentrace cholesterolu. Poslední výzkumy naznačují, že NP-C negativně ovlivňuje synaptický přenos neurotransmiterů v CNS, aktivuje mikroglie a zvyšuje apoptotózu neuronů.

Klinické příznaky

První zpráva o nemoci pochází od německého pediatra Alberta Niemanna (1880–1921), který v 1914 popsal dítě s hepatosplenomegalií a neurologickým postižením. Autoptické tkáně dětí s obdobnými příznaky analyzoval Ludwig Pick (1868–1944), jenž v nich objevil dosud neznámou akumulací lipidů. Na základě přítomnosti buněk s pěnovitou cytoplazmou v kostní dřeni a zvýšeným množstvím sfingomyelinu ve tkáních byli v roce 1958 Crockerem a Farberem tito pacienti zařazeni pod klinickou jednotku nazvanou Niemannova-Pickova nemoc. Klinické příznaky pacientů s NPD byly heterogenní a zahrnovaly nemocné různého věku s neurologickou a/nebo čistě viscerální symptomatologií, podle které byly počátkem 60. let rozlišovány 4 typy NPD (A–D).

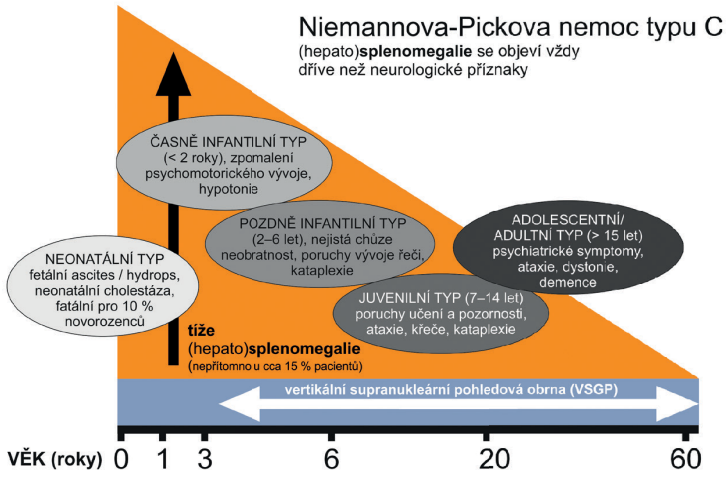
V letech 1966–67 Brady a Kanfer prokázali, že původní typy Niemannovy-Pickovy nemoci A a B jsou způsobeny poruchou kyselé sfingomyelinázy. Názor, že Niemannova-Pickova nemoc C a D představuje samostatné onemocnění, odlišné od deficitu kyselé sfingomyelinázy, byla výsledkem mezinárodní konference pořádané v 1982 v Praze prof. MUDr. Milanem Ellederem, DrSc. V roce 1984 Pentchev prokázal na myším modelu, že příčina NP-C spočívá v intracelulární poruše transportu exogenního cholesterolu, a v letech 1997 a 2000 byly objeveny geny *NPC1 a NPC2*, jejichž mutace vedou ke klinickému onemocnění NP-C. Až později se ukázalo, že původní Niemannova-Pickova nemoc typu D není samostatné onemocnění; jedná se o pacienty s NP-C s prevalentní mutací v genu *NPC1* v oblasti Nového Skotska v Kanadě.

NP-C je neuroviscerální nemoc se širokým klinickým spektrem příznaků a variabilním věkem manifestace. Na jedné straně se může projevit již v novorozeneckém věku fatálním respiračním a jaterním postižením, na straně druhé se může projevit až v dospělosti jako mírná psychiatrická porucha nebo asymptomatická splenomegalie. Podle věku při nástupu neuropsychiatrických příznaků se NP-C dělí na časně infantilní, pozdně infantilní, juvenilní (klasickou), adolescentní a adultní formu *(viz obr. 8.5.3)*.

Vzácná je **intrauterinní a neonatální forma NP-C** charakterizovaná hydropsem plodu nebo přítomností prolongovaného cholestatického ikteru s hepatosplenomegalií, hepatopatií a respirační insuficiencí. Asi 10 % postižených novorozenců umírá, ale u většiny z nich cholestatický ikterus po 2. měsíci života ustupuje a přetrvává pouze hepatosplenomegalie, k níž se po různě dlouhém časovém intervalu přidruží neurologické a/nebo psychiatrické příznaky.

Časně infantilní forma NP-C se projevuje rozvojem neurologických obtíží ve věku mezi 2 měsíci a 2 roky. Začíná obvykle nespecificky opožděním psychomotorického vývoje s centrální hypotonií. Po druhém roce dochází k regresi vývoje s rozvojem spasticity a cerebelární symptomatologie, v ojedinělých případech byla popsána porucha sluchu. Epilepsie nebývá primárním příznakem této formy nemoci. Jeden z typických klinických příznaků NP-C, vertikální supranukleární pohledová obrna (VSGP – *vertical supranuclear gaze palsy*), se u malých dětí jen obtížně diagnostikuje. Většina postižených umírá do několika let.

Pozdně infantilní forma NP-C se projevuje rozvojem neurologických příznaků ve věku 2–6 let. Patrná je neobratnost, nejistá chůze, pomalejší rozvoj řeči. První známkou



Obr. 8.5.3 Charakteristika různých forem Niemannovy–Pickovy nemoci typu C *(upraveno dle: Vanier, 2010)*

může být i gelastická kataplexie (stavy náhlého ochabnutí s vazbou na smích). Postupně se prohlubuje stagnace mentálního vývoje s následným regresem, u některých dětí se mohou objevit epileptické záchvaty. Později se přidává spasticita, výrazná dysartrie, dysfagie tekutin i tuhých soust s rizikem aspirace, často je nutná gastrostomie. Většinou je přítomná vertikální supranukleární pohledová obrna, ale u malých dětí není snadné ji rozpoznat. V době rozvoje neurologické symptomatologie je prakticky u všech pacientů přítomná i splenomegalie, někdy přetrvávající již od novorozeneckého či kojeneckého věku. Postižené děti většinou umírají na rozhraní první a druhé dekády v důsledku respiračních komplikací.

Juvenilní forma (klasická forma NP-C) je charakterizována nenápadným rozvojem neurologických příznaků ve školním věku, mezi které patří poruchy učení, dyspraxie, poruchy pozornosti a aktivity, poruchy artikulace, včetně zadrhávání, jež však mohou zůstat poměrně dlouho bez progrese. Většina dětí má i splenomegalii, která často přetrvává od novorozeneckého či kojeneckého věku. Častým nálezem je vertikální supranukleární pohledová obrna směrem dolů, která však může mít zpočátku kolísavý charakter a nemusí být patrná v každé poloze. Mezi další projevy nemoci patří kataplexie, někdy doprovázená narkolepsií. Při progresi onemocnění se zhoršuje ataxie, dysfagie, dysartrie a dystonie při chůzi a postupně a nerovnoměrně progreduje mentální deteriorace, především v oblasti exekutivních funkcí. Mohou se objevit i různé typy epileptických záchvatů, jež však poměrně dobře reagují na antiepileptickou léčbu. Při další progresi se zvýrazňuje spasticita a těžká dystonicko-dyskinetická symptomatologie. Délka života závisí na kvalitě symptomatické péče a prevenci sekundárních komplikací, nejčastěji aspirace.

Pokud se neurologické příznaky objeví po 15. roce věku, používá se označení **adolescentní,** respektive **adultní forma NP-C**. Adolescentní forma se většinou liší od juvenilní pouze časovým nástupem neurologických obtíží, které jsou jinak velmi podobné.

Méně často se u adolescentních pacientů setkáváme s gelastickou kataplexií. Pro adultní formu jsou typické příznaky neuropsychiatrického charakteru, jež progredují s různou intenzitou a setkáváme se i s kolísavým průběhem s epizodami zlepšení psychiatrické symptomatologie následovanými relapsy. U pacientů byly popsány maniodepresivní či schizofrenní psychózy, poruchy spánku, poruchy chování, obsedantně-kompulzivní poruchy, anxiózně-depresivní symptomatologie, halucinace.

Teprve v odstupu několika let se přidruží neurologická symptomatologie, zejména dysartrie, dysfagie, cerebelární příznaky, dystonie. U většiny pacientů lze při progresi nemoci prokázat vertikální pohledovou obrnu s hypometrií sakád. Rychlá progrese postižení exekutivních funkcí s relativně dlouho neovlivněnou kognitivní složkou je typický obraz postižení mentálních schopností u dospělých pacientů. Rychlost zpracování informací je významně zpomalená a verbální paměť porušená. Kognitivní poruchy začínají frontálně-subkortikálním deficitem a postupně progredují do presenilní kognitivní deteriorace až demence. Jakmile se u dospělých pacientů s kolísavými psychiatrickými příznaky objeví neurologická symptomatologie, stav obvykle rychle progreduje k obrazu popisovanému u pozdně juvenilních a adolescentních forem onemocnění.

Splenomegalie, méně často hepatosplenomegalie je u většiny dospělých pacientů s neuropsychiatrickou symptomatologií prokazatelná, nemusí však být výrazná. U některých nemocných byla splenomegalie či hepatosplenomegalie popsána v dětském věku, ale následně mohlo dojít i k normalizaci velikosti jater a sleziny. Variabilitu klinického obrazu NP-C v dospělé populaci dokumentují i případy pacientů, u kterých bylo onemocnění diagnostikováno pouze na podkladě splenomegalie, přičemž neuropsychiatrická symptomatologie nebyla přítomná.

Diagnostika

Je založena na klinickém podezření. V rámci biochemického a hematologického vyšetření nacházíme nespecifické nálezy, které zahrnují mírnou trombocytopenii, vyšší aminotransferázy a/nebo dyslipidemii (zvýšený celkový cholesterol, LDL cholesterol a triacylglyceridy a snížený HDL cholesterol). U neonatální formy jsou pozorovány biochemické nálezy typické pro cholestázu. Elektrofyziologické metody (EEG, EMG, evokované potenciály) nemají specifický obraz. Při zobrazení CNS je často přítomen normální nález a/nebo je popisována nevýrazná kortikální a cerebelární atrofie či leukodystrofické změny. V rámci oftalmologického vyšetření je někdy zkušeným oftalmologem popsána vertikální pohledová obrna, v naprosté většině případů však VSGP a hypometrii sakád zaznamená pouze neurolog.

Zvýšená aktivita lysosomálního enzymu chitotriosidázy podporuje podezření na onemocnění ze skupiny lysosomálních poruch s aktivací makrofágů (retikuloendotelového systému). Extrémně zvýšená aktivita chitotriosidázy je typická pro pacienty s Gaucherovu nemocí; u pacientů s NP-C je obvykle jen mírně až středně zvýšená, ale může být i normální. Chitotriosidázu nelze použít jako diagnostický marker u cca 6 % populace s vrozeným deficitem chitotriosidázy. Protože jde o marker nespecifický, vázaný na aktivaci makrofágů, může být aktivita chitotriosidázy nespecificky zvýšená i u některých dalších onemocnění, například roztroušené sklerózy, sarkoidózy, malárie, tuberkulózy, talasemie, pokročilé aterosklerózy a dalších.

Stanovení enzymové aktivity kyselé sfingomyelinázy pomůže odlišit Niemannovu-Pickovu nemoc typu A/B. Podobnou možnost u NP-C nemáme, protože jde o deficit transportních proteinů, nikoli enzymopatii.

NOVÝ

Index klinické suspekce Niemann-Pickovy choroby typu C

Správně rozpoznaná kombinace projevů a symptomů zlepší diagnostiku Niemann-Pickovy choroby typu C (NP-C)

NPC-SI.cz

Navštivte **www.npc-si.cz**, kde zjistíte více o projevech NP-C a můžete vyhodnotit Index klinické suspekce NP-C.

ZKRÁCENÁ INFORMACE O LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU ZAVESCA

Název přípravku: Zavesca 100 mg tvrdé tobolky. **Složení:** 1 tobolka obsahuje miglustatum 100 mg. Pomocné látky. **Terapeutické indikace:** Perorální léčba dospělých pacientů s mírnou až střední formou Gaucherovy choroby typu 1, pro které není vhodná enzymatická substituční terapie. Léčba progredujících neurologických projevů u dospělých a dětských pacientů s Niemannovou-Pickovou chorobou typu C. **Dávkování a způsob podání:** Lékař musí mít zkušenosti s léčbou Gaucherovy, resp. Niemannovy-Pickovy choroby typu C. Gaucherova choroba typu 1: Doporučená úvodní dávka u dospělých pacientů je 100 mg 3x denně. Kvůli průjmům může být nutné dočasné snížení dávky na 100 mg 1x nebo 2x denně. U dětí a dospívajících ve věku 0-17 let nejsou k dispozici žádné údaje. Niemann-Pickova choroba typu C: Doporučená dávka pro dospělé a mladistvé pacienty (ve věku 12 let a starší) je 200 mg 3x denně. Dávkování u pacientů mladších 12 let by se mělo upravit vzhledem k povrchu těla v m^2 následovně: plocha povrchu těla >1,25 m^2 200 mg 3x denně, >0,88–1,25 m^2 200 mg 2x denně, >0,73–0,88 m^2 100 mg 3x denně, >0,47–0,73 m^2 100 mg 2x denně a ≤0,47 m^2 100 mg 1x denně. U některých pacientů je nutné dočasné snížení dávky vzhledem k průjmu. Prospěch léčby je třeba pravidelně vyhodnocovat. U pacientů s Niemann-Pickovou chorobou typu C mladších 4 let jsou jen omezené zkušenosti. Zvláštní populace: Neexistuje žádná zkušenost s použitím přípravku u pacientů starších 70 let. U pacientů s poškozením ledvin a upravenou clearance kreatininu 50–70 ml/min/1,73 m^2 musí být podávání zahájeno dávkou 100 mg 2x denně u Gaucherovy choroby typu 1 a dávkou 200 mg 2x denně (upravenou vzhledem k tělesnému povrchu u pacientů mladších 12 let) u Niemann-Pickovy choroby typu C; s upravenou clearance kreatininu 30–50 ml/min/1,73 m^2 dávkou jednou 100 mg 1x denně u Gaucherovy choroby typu 1 a dávkou 100 mg 2x denně (upravenou vzhledem k tělesnému povrchu u pacientů mladších 12 let) u Niemann-Pickovy choroby typu C. Užití u pacientů s vážným poškozením ledvin (clearance kreatininu <30 ml/min/1,73 m^2) se nedoporučuje. U pacientů s poškozením jater nebyl přípravek hodnocen. Zavesca se může užívat s jídlem i bez jídla. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo kteroukoli pomocnou látku. **Zvláštní upozornění a opatření pro použití:** Třes obvykle začal během prvního měsíce a ustoupil v průběhu léčby mezi prvním až třetím měsícem. Snížení dávky může třes zlepšit, ale někdy může být nezbytné přerušení léčby. Miglustatem navozené gastrointestinální příhody, zejm. průjmy, reagují na individualizovanou úpravu diety, na užívání přípravku Zavesca mezi jídly a/nebo protiprůjmové léky jako loperamid. U některých pacientů může být nutné dočasné snížení dávky. Miglustat u potkanů nepříznivě ovlivňuje spermatogenezu, parametry spermatu a snižuje plodnost. Muži musí před plánovaným početím přestat užívat přípravek Zavesca a používat spolehlivou antikoncepci ještě další 3 měsíce po jeho vysazení. U Gaucherovy choroby typu 1 neexistuje důkaz o tom, že je Zavesca v účinnosti a bezpečnosti prospěšnější než ERT (Enzyme Replacement Therapy). Byly hlášeny případy periferní neuropatie s nebo bez souběžných stavů, jako jsou nedostatek vitaminu B12 a monoklonální gamapatie. Všichni pacienti musí podstoupit neurologické vyšetření před zahájením a dále opakovaně v průběhu léčby. Doporučuje se sledování počtu krevních destiček. Přínos léčby přípravkem Zavesca u Niemann-Pickovy choroby typu C by se měl pravidelně vyhodnocovat, např. každých 6 měsíců. Byla pozorována mírná snížení počtu krevních destiček bez souvislosti s krvácením, doporučuje se sledování počtu destiček. U některých pediatrických pacientů s Niemann-Pickovou chorobou typu C byl v časné fázi léčby miglustatem hlášen zpomalený růst, u nich a dospívajících by se měl růst monitorovat. **Interakce s jinými léčivými přípravky:** Současné podávání přípravku Zavesca a enzymatické substituce imiglucerázou u Gaucherovy choroby typu 1 může mít za následek snížené působení miglustatu. Zavesca pravděpodobně nemá žádný nebo pouze omezený vliv na farmakokinetiku imiglucerázy. **Fertilita, těhotenství a kojení:** Miglustat prostupuje placentou. Přípravek Zavesca nesmí být užíván v těhotenství a během kojení. Ženy v reprodukčním věku i mužští pacienti musí používat spolehlivý způsob antikoncepce. **Účinky na schopnost řídit a obsluhovat stroje:** Zavesca má zanedbatelný vliv na schopnost řídit nebo obsluhovat stroje. Pacienti trpící závratí, nesmí řídit vozidla nebo obsluhovat stroje. **Nežádoucí účinky:** Velmi časté: úbytek tělesné hmotnosti, pokles chuti k jídlu, třes, průjem, flatulence, bolest břicha. Časté: trombocytopenie, deprese, insomnie, pokles libida, periferní neuropatie, ataxie, amnézie, parestézie, hypoestézie, bolest hlavy, závrať, nauzea, zvracení, břišní distenze/diskomfort, zácpa, dyspepsie, svalové křeče a slabost, únava, astenie, zimnice a malátnost, abnormální výsledky studií nervového vedení. **Předávkování:** V případě předávkování se doporučuje obecná lékařská péče. **Zvláštní opatření pro uchovávání:** Uchovávejte při teplotě do 30°C. **Balení:** Krabička obsahuje 4 blistry po 21 tobolkách, celkem 84 tobolek. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Actelion Registration Ltd, Chiswick Tower, London W4 4AL, Velká Británie. **Reg. č.:** EU/1/02/238/001. **Způsob výdeje a úhrady:** Přípravek je vázán na lékařský předpis a je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. **Datum revize textu:** Říjen 2015. Před předepsáním léku se prosím seznamte s úplnou informací o přípravku.

Actelion Pharmaceuticals CZ, s.r.o., Francouzská 171/28, 120 00 Praha 2
tel: + 420 221 968 006, www.actelion.cz ZAV-03-08-16-0298

ACTELION

Nátěr kostní dřeně, který je u některých pacientů prováděn např. pro chronickou splenomegalii, ukáže přítomnost specifických makrofágů, tzv. *sea blue* histiocytů. Odlišení specifických makrofágů u NP-C od specifických makrofágů typických pro deficit kyselé sfingomyelinázy umožní histopatologické vyšetření v polarizovaném světle, při kterém jsou depozita lipidů v makrofázích u NP-A/B anizotropní, zatímco u NP-C izotropní *(viz obr. 8.5.1)*. Specifické histiocyty a některé další specifické histopatologické nálezy je možné prokázat i v dalších orgánech (slezina, játra, plíce, lymfatické uzliny, mozek). Při elektronoptickém vyšetření vzorků z jaterní a kožní biopsie mohou být u NP-C prokázána patognomická polymorfní cytoplazmatická tělíska (PCB).

Mezi specifická diagnostická vyšetření u NP-C patří tzv. filipinový test, jenž spočívá v detekci neesterifikovaného cholesterolu hromadícího se v perinukleárních lysosomech ve vzorku tkáňové kultury kožních fibroblastů *(viz obr. 8.5.2)*. Barvení je prováděno antibiotikem filipinem, ten se váže na cholesterol a je detekovatelný při fluorescenční mikroskopii. Přibližně u 20 % pacientů s NP-C (zejména u pozdních forem nemoci) vidíme variabilní obraz testu, kdy hodnocení nemusí být zcela jednoznačné. Méně specifický je test rychlosti esterifikace značeného LDL cholesterolu.

Diagnostika nemoci je nyní založena na molekulárně genetickém vyšetření dvou genů pro NP-C. Přibližně u 95 % pacientů nacházíme mutace v genu *NPC1* (na chromosomu 18q11–12), popsáno již bylo > 300 patogenních mutací. Mezi nejčastější mutace v evropské populaci patří c.3182T>C; p.Ile1061Thr a c.3019C>G; p.Pro1007Ala, jež se vyskytují asi u 1/3 nemocných. U českých pacientů je nejčastější mutace c.3557G>A; p.Arg1186His (vyskytuje se asi ve 20 % případů). U < 5 % pacientů jsou popisovány mutace v genu *NPC2* (na chromosomu 14q24.3). Jedná se většinou o novorozence s těžkou neonatální formou NP-C s jaterním a/nebo respiračním selháním, případně o časně infantilní formu NP-C s rychle progredujícím neuroviscerálním postižením. Nejčastější mutace v genu *NPC2* je c.58G>T; p.Glu20*.

Ve fázi výzkumu je snaha najít specifické biochemické markery umožňující včasnou diagnostiku i monitorování léčby. V některých centrech se již v plazmě pacientů stanovují některé oxysteroly (zejména Chol-triol a 7-ketocholesterol) a lysosfingomyelin 509.

Terapie

Kauzální terapie pacientů s NP-C zatím není známá. Pokusy ovlivnit průběh nemoci snížením hladiny cholesterolu dietou či léky byly neúspěšné a výsledky nepřinesla ani transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT). Symptomatická léčba konkrétních příznaků zahrnuje antiepileptickou terapii, podávání tricyklických antidepresiv k ovlivnění kataplexie, anticholinergik, benzodiazepinů nebo derivátů GABA ke zmírnění dystonie a tremoru. Psychofarmaka a atypická antipsychotika se využívají k léčbě psychóz. Progredující dysfagii s rizikem aspirace lze řešit prostřednictvím gastrostomie. Profylaxe respiračních komplikací zahrnuje rovněž antibiotickou a bronchodilatační terapii, fyzioterapii, drenážní polohování či masáže hrudníku. V neposlední řadě je nutná psychosociální podpora pacientů i členů postižené rodiny.

Za léčbu modifikující průběh nemoci je považována substrát redukující terapie (SRT) s perorálním podáváním miglustatu, který obsahuje N-butyldeoxynojirimycin. Je to iminoderivát sacharidu, který působí jako kompetitivní inhibitor enzymu glukosylceramidsyntázy, čímž snižuje syntézu glukosylceramidu a glykosfingolipidů. Jde o malou molekulu, která prostupuje hematoencefalickou bariérou a snižuje nabídku substrátu (sfingolipidů) v lysosomech, což zpomaluje střádání. Výsledky studií se SRT u pacientů s NP-C svědčí pro zpomalení progrese nemoci až stabilizaci neurologických příznaků.

Mezi nežádoucí účinky patří průjmy s možnou ztrátou hmotnosti a třes. Průjmy lze výrazně omezit dodržováním dietních opatření.

Nově se zkouší subkutánní podávání 2-hydroxypropyl-β-cyklodextrinu a jeho homologů, jež částečně umožní obejít blok transportu neesterifikovaného cholesterolu z lysosomu. Další testované terapeutické možnosti zahrnují ovlivnění intracelulární homeostázy kalcia pomocí kurkuminu, ovlivnění zvýšené exprese enzymu GTPázy-Rab9 snižující akumulaci lipidů a využití inhibitorů specifických izoforem histonových deacetyláz.

Literatura:

1. Jahnová H et al.: Diagnostika a možnosti léčby Niemann-Pickovy choroby typ C. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 2012; 75/108(3): 303–308.
2. Jahnová H et al.: Observational, retrospective study of a large cohort of patients with Niemann-Pick disease type C in the Czech Republic: a surprisingly stable diagnostic rate spanning almost 40 years. *Orphanet J Rare Dis* 2014; 9: 140.
3. Vanier MT: Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 2010; 5: 16.
4. Vanier MT: Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38: 187–199.

8.6 Gaucherova nemoc

Martin Magner, Tomáš Honzík, Jiří Zeman

Kazuistika

Chlapec se narodil ze druhé, nekomplikované gravidity v termínu, s porodní hmotností 2900 g a délkou 49 cm. Oba rodiče i sestra jsou zdrávi. Poporodní adaptace a psychomotorický vývoj byly v pořádku, od 2 let věku byl bez plen. Ve věku 3,5 roku si chlapec začal stěžoval na únavu, bolesti břiška a občasné bolesti hlavy. Praktický lékař u chlapce zjistil hepatosplenomegalii a trombocytopenii (122×10^9/l). Chlapce doporučil k vyšetření na spádovém klinickém pracovišti, odkud byl pro podezření na Gaucherovu nemoc přeložen na naše pracoviště.

Chlapec měl těžkou poruchu růstu (výška 96 cm, < 3. percentil), hmotnost 14 kg a obvod hlavy 50 cm odpovídaly věku. Měl mírnou hepatomegalii (+3 cm) a výraznou splenomegalii (+14 cm), ale bez lymfadenopatie (*viz obr. 8.6.1*). Neurologické vyšetření bylo bez ložiskového nálezu. Sonografické vyšetření potvrdilo klinický nález splenomegalie a hepatomegalie s difuzně vyšší echogenitou. Objem sleziny byl 10× větší, než je věková norma, a objem jater byl oproti normě zvětšen 2,5násobně. Vyšetření krevního obrazu ukázalo mírnou leukopenii ($4{,}4 \times 10^9$/l, norma > 5,5), mírnou anemii (hemoglobin 109 g/l, norma 110–135) a trombocytopenii (82×10^9/l, norma > 150). Aminotransferázy byly mírně zvýšené (ALT 0,63 µkat/l a AST 1,19 µkat/l, norma < 0,6) a Quickův test byl hraniční (INR 1,34, norma 0,9–1,2).

Obr. 8.6.1 **3,5letý chlapec s Gaucherovou nemocí a hepatosplenomegalií před zahájením léčby**

Metabolické vyšetření potvrdilo podezření na Gaucherovu nemoc a ukázalo extrémně vysokou hladinu chitotriosidázy, která při další kontrole ještě stoupala (z 8730 na 12 160 nmol/hod/ml, norma < 89). Aktivaci monocyto-makrofágového systému potvrdila i vysoká aktivita kyselé fosfatázy (401 nkat/l, norma < 108). Enzymatické vyšetření v izolovaných leukocytech ukázalo významně sníženou aktivitu glukocerebrosidázy (1,5 nmol/hod a mg proteinu, referenční rozmezí 6,2–16,4). Diagnóza Gaucherovy nemoci byla potvrzena i na molekulárně genetické úrovni zjištěním, že chlapec je v genu *GBA* pro glukocerebrosidázu složený heterozygot pro mutace c.[934C>G]; [1226A>C]; p.[His237Asp]; [Asn370Ser]. Klinický průběh onemocnění a přítomnost prevalentní mutace c.1226A>C; p.Asn370Ser predikovala, že se u chlapce jedná o Gaucherovu nemoc typu I, tedy formu bez postižení CNS.

Byla zahájena enzymová substituční terapie (ERT – *enzyme replacement therapy*) pomocí rekombinantně připravené glukocerebrosidázy v intravenózní infuzi jednou za 2 týdny. Již po 3 měsících terapie ustoupila únava a bolesti břicha, došlo ke zmenšení jater (+1 cm) i sleziny (+8 cm), krevní obraz se upravil a poklesla rovněž aktivita chitotriosidázy (6649 nmol/hod/ml).

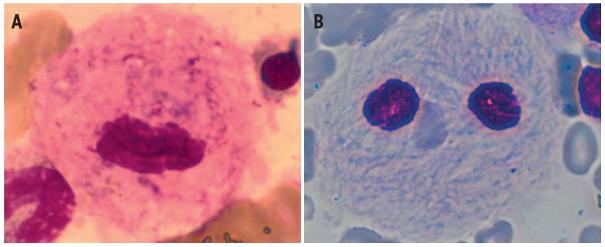
Teoretická část

Etiologie

Gaucherova nemoc (GD) je onemocnění s lysosomálním střádáním způsobené poruchou kyselé β-glukocerebrosidázy (GBA), která v lysosomu odštěpuje glukózu od ceramidu (sfingosin + mastná kyselina). Dědičnost je autosomálně recesivní a výskyt v populaci se pohybuje mezi 1 : 40 000 a 1 : 50 000 (nicméně u aškenázských židů se GD vyskytuje mnohem častěji – 1 : 850).

Patofyziologickým podkladem onemocnění je lysosomální střádání nerozloženého glukocerebrosidu v buňkách monocyto-makrofágového systému se závažným dopadem na jejich funkce. Velké pěnité makrofágy naplněné glukosylceramidem se nazývají Gaucherovy buňky (*viz obr. 8.6.2A a B*). Histologicky se vyznačují malým excentricky

uloženým jádrem obklopeným světlou rýhovanou cytoplazmou připomínající pomačkaný papír. Pro GD jsou charakteristické, nicméně se mohou vyskytnou i u jiných lipidóz. Nejčastěji jsou postiženy kostní dřeň, retikuloendotelový systém sleziny, Kupfferovy buňky v játrech a osteoklasty, ale střádání může postihnout i další tkáně a orgány včetně CNS, plic, srdce a oka (sklivec).



Obr. 8.6.2 Cytologický obraz lysosomálního střádání v makrofázích v nátěru kostní dřeně u dívky s Gaucherovou nemocí:
A) střádací buňka Gaucherova typu;
B) dvě Gaucherovy buňky s charakteristickou striovanou cytoplazmou.
(S laskavostí poskytla MUDr. Helena Hůlková, Ph.D., ÚDMP 1. LF UK a VFN v Praze.)

Původní mechanistická teorie předpokládala alteraci funkce postižené buňky v důsledku nahromadění glukocerebrosidu v lysosomu. Pozdější poznatky prokázaly, že se jedná o komplexní proces s narušením buněčné homeostázy vedoucí až k plánované buněčné smrti – apoptóze. Glukocerebrosidáza je syntetizována a glykosylována v endoplazmatickém retikulu, transportována do Golgiho aparátu a následně do lysosomu. Nesprávně sbalený proteinový produkt mutovaného genu je pak „zadržen" v endoplazmatickém retikulu, kde podléhá degradaci.

Procento proteinu, jenž se rozloží v endoplazmatickém retikulu, je jedním z faktorů, které určují tíži GD, protože vyvolává indukovanou stresovou odpověď. Mimo jiné aktivované makrofágy vylučují zvýšené množství cytokinů (IL-6, IL-10, TNF-α, IL-1β), jež se uplatňují při rozvoji chronického zánětu. Současně dochází ke zvýšené expresi povrchových receptorů na buňkách imunitního systému včetně makrofágů, T buněk, B buněk i NK buněk. Aktivace makrofágů vede ke změně buněčné biologie včetně abnormálních inter- či intracelulárních signálů. Chronická aktivace imunitního systému může mít za následek klonální expanzi B buněk s častým rozvojem monoklonální či polyklonální gamapatie, MGUS *(monoclonal gammopathy of undetermined significance)*, myelomu a podílí se i na stimulaci osteoklastů a tím na patofyziologii kostních změn. Na osteolytických krizích se podílí rovněž ischemie, kdy expanze červené kostní dřeně vytlačující do periferie dřeňové dutiny žlutou kostní dřeň způsobí uzávěr drobných cév.

Klinické projevy

Na základě klinických projevů se u pacientů s GD tradičně rozlišují tři typy onemocnění *(viz tab. 8.6.1)*. Ve skutečnosti jde o jedno onemocnění s kontinuálním spektrem klinických příznaků od zcela mírných až po extrémně závažné. Vůbec nejtěžší manifestací GD, která se z předchozí klasifikace 3 typů GD zcela vymyká, je hydrops plodu.

Nejčastější je **non-neuronopatický typ 1**, který se vyznačuje významnou splenomegalií, mírnější hepatomegalií, postižením dlouhých kostí, anemií, leukopenií a trombocytopenií, ale nedochází k závažnějšímu postižení centrální nervové soustavy (CNS).

Akutní neuronopatický typ 2 se projevuje již v kojeneckém věku hepatosplenomegalií, neprospíváním, strabismem nebo nystagmem a rychle progredujícím postižením CNS se zástavou psychomotorického vývoje a opistotonem.

Subakutní neuronopatický typ 3 začíná v batolecím či předškolním věku, postihuje CNS, ale probíhá pomaleji než typ 2. Častá je porucha okohybných nervů.

Tab. 8.6.1 Klinická klasifikace Gaucherovy nemoci *(upraveno dle: Nagral et al., 2015)*

Gaucherova nemoc	typ 1	typ 2	typ 3
Nástup onemocnění	dětství/dospělost	kojenecký věk	dětství/dospělost
Hepatosplenomegalie	+	+	+
Zvýšený výskyt	aškenázští židé	?	švédská provincie Norrbotten
Kostní postižení	+	–	+
Oční příznaky	–	+	+
Neurologické postižení	–	++	+
Postižení jiných orgánů	jaterní cirhóza, plicní hypertenze	hydrops, kongenitální ichtyóza	kalcifikace cév
Přežití	časné dětství až pozdní dospělost	< 2 roky	variabilní až do časné dospělosti
Odpověď na ERT	dobrá	špatná, není indikována	variabilní

Pozn.: ERT = enzymová substituční terapie.

Gaucherova nemoc typu 1 se může manifestovat kdykoli od kojeneckého věku až po pozdní dospělost. Časnější nástup klinických projevů je obvykle spojován se závažnějším průběhem onemocnění. Mezi nejčastější příznaky patří zejména výrazná splenomegalie a mírnější hepatomegalie, jež mohou vést k masivní břišní distenzi *(viz obr. 8.6.3A)*. Velká hepatosplenomegalie vede k pocitu plnosti a sníženému perorálnímu příjmu s eventuálním neprospíváním a poruchou růstu. Příčinou akutních prudkých bolestí břicha jsou infarkty ve slezině. Pacienti s GD typu 1 si stěžují na únavu, mívají tachykardii, epistaxi a časté modřiny. Tíže uvedených příznaků závisí na závažnosti anemie, jež si u některých pacientů vyžádá opakované transfuze, a na trombocytopenii. Důvodem progredující cytopenie je nejen hypersplenismus, ale též infiltrace kostní dřeně Gaucherovými buňkami a nejspíš i enzymatická porucha v samotných hematopoetických kmenových buňkách.

mikrognatie
mitofagie
mitochondriální DNA
mitochondriální onemocnění
mozeček
mukopolysacharidy
myelin
myopatie

N
nefrolithiáza
nefromegalie
nefrotický syndrom
neketotické hypoglykemie
neocerebelární symptomatologie
neprospívání
neurodegenerace
neuroinflamace
neuropatie
neurotransmitery
neuroviscerální příznaky/ataky
neutropenie
nitison (orfadin, NTBC)
nízkobílkovinná dieta
NMDA receptory
novorozenecký screening
nystagmus

O
obličej panenky
oftalmoplegie
okulogyrní krize
oligofrenie
oligosacharidózy
oligosacharidy
onemocnění ze střádání esteru cholesterolu
opsoklonus
optická koherenční tomografie
osteolytické krize
osteopenie
osteoporóza
2-oxoglutarát
oxysteroly

P
pachygyrie
paleocerebelární symptomatologie
pancytopenie
pankreatitida
parestezie
penetrance onemocnění
pěnité makrofágy (*foam cells*)
peroxiny
pes cavus
pigmentová retinopatie
pilli torti
polydaktylie
polymikrogyrie
porfobilinogen
porucha
– chování
– růstu
– sluchu
– učení
– vědomí
potraviny pro zvláštní lékařské účely
prolaps mitrální chlopně
proteinocytologická disociace
proteinurie
průjem
psychiatrické poruchy
psychomotorická retardace
psychóza
ptóza
puriny
pyridoxal-5-fosfát
pyrimidiny
pyrofosfát

R
ragged red fibres
rachitis
rachitický růženec
regres vývoje
renální koliky
respirační alkalóza
retinální gangliové buňky
retinitis pigmentosa
Reye-like syndrom
rhabdomyolýza

S
sacharidy-responzivní příznaky
sacharóza
saposiny
sea blue histiocyte
sebepoškozování (automutilace)
sfingomyelin
sirné aminokyseliny
spánková apnoe
spasticita
spastická paraparéza
steatorea
steatóza
strabismus
stres endoplazmatického retikula
stridor
subdurální hematom
substrát redukující terapie
suchá krevní kapka
sukcinylaceton
sulfatidy
syndaktylie
syndrom okcipitálního rohu
syndrom posteriorní reverzibilní encefalopatie
syndrom preexcitace
systém oxidativní fosforylace

Š
škrob

T
tečkovité kalcifikace (*calcific stippling*)
tetrahydrobiopterin
transplantace
– jater
– kostní dřeně
trombocytopenie
tromboembolické příhody
třešňová skvrna
tubulární porucha ledvin
tyrosin

U
urolitiáza

V
vakuoly v lymfocytech
velmi dlouhé mastné kyseliny
ventrikulomegalie
vertikální supranukleární pohledová obrna
větvené aminokyseliny
vitamin B_{12}
vpáčení prsních bradavek, invertace mamil

W
Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom
Wolmanova nemoc

X
xanthin

Z
zákal rohovky
záněty středouší
zraková ostrost
zvracení

Normosang®

25 mg/ml, koncentrát pro infuzní roztok

lidský hemin

SOUHRN ÚDAJŮ O PŘÍPRAVKU

1. NÁZEV PŘÍPRAVKU Normosang 25 mg/ml, koncentrát pro infuzní roztok. **2. KVALITATIVNÍ A KVANTITATIVNÍ SLOŽENÍ** Lidský hemin 25 mg/mL. Jedna ampulka o objemu 10 ml obsahuje 250 mg lidského heminu. Po naředění jedné 10 ml ampulky ve 100 ml 0,9% roztoku NaCl obsahuje naředěný roztok 22/3 mikrogramů lidského heminu na jeden ml. Pomocné látky se známým účinkem: etanol 96 % (1 g/10 ml) (viz bod 4.4). Úplný seznam pomocných látek viz bod 6.1. **3. LÉKOVÁ FORMA** Koncentrát pro infuzní roztok. Normosang je tmavě zbarvený roztok koncentrátu pro infuzní roztok. **4. KLINICKÉ ÚDAJE** 4.1. **Terapeutické indikace** Léčba akutních záchvatů jaterní porfyrie (akutní intermitentní porfyrie, porphyria variegata, hereditární koproporfyrie). 4.2. **Dávkování a způsob podání** *Dávkování* Doporučená denní dávka je 3 mg/kg jednou denně po dobu čtyř dnů, naředěná ve 100 ml 0,9% chloridu sodného ve skleněné lahvi a podávaná intravenózní infuzí po dobu alespoň 30 minut do velké předloketní nebo centrální žíly s použitím vloženého filtru. Dávka nemá překročit 250 mg (1 ampulka) denně. Výjimečně může být léčebná kúra za přísného biochemického dozoru opakována, pokud je na první léčebnou kúru nedostatečná reakce. Starší pacienti Není nutná žádná úprava dávky. *Děti a mladiství* Záchvaty porfyrie jsou u dětí vzácné, ale omezené zkušenosti s tyrosinémií svědčí pro to, že je bezpečné použít dávku nepřesahující 3 mg/kg denně po dobu 4 dnů, podávanou za stejných bezpečnostních opatření jako u dospělých osob. Způsob podání Infuze je nutné podávat do velké předloketní nebo centrální žíly po dobu alespoň 30 minut. Po infuzi je třeba žílu propláchnout 100 ml 0,9% NaCl. Doporučuje se nejprve vypláchnout žílu 3 až 4 bolusovými injekcemi 10 ml 0,9% NaCl, po kterých může být zbývající objem fyziologického roztoku infundován po dobu 10 - 15 minut. Návod na přípravu roztoku je uveden v bodě 6.6. 4.3. **Kontraindikace** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku uvedenou v bodě 6.1. 4.4. **Zvláštní upozornění a opatření pro použití** Před zahájením léčby je nutné potvrdit záchvat jaterní porfyrie řadou klinických a biologických kritérií: - přesvědčivá rodinná nebo osobní anamnéza, - přesvědčivé klinické příznaky, - kvantitativní stanovení kyseliny delta-aminolevulové a porfobilinogenu v moči (přednostně oproti klasickým testům podle Watson-Schwarz nebo Hoeschě, které jsou považovány za méně spolehlivé). Čím dříve po začátku záchvatu se zahájí léčba přípravkem Normosang, tím vyšší je její účinnost. Výsledkem podávání infuzí přípravku Normosang je to, že bolesti břicha a další gastrointestinální příznaky obvykle během 2 - 4 dnů vymizí. Neurologické komplikace (paralýza a psychické poruchy) jsou léčbou ovlivněny méně. Protože porfyrické záchvaty jsou často spojeny s různými kardiovaskulárními a neurologickými manifestacemi, je třeba zajistit vhodné sledování pacienta. Je také důležité varovat pacienty před rizikem, že záchvaty jsou zhoršovány či vyvolávány hladověním nebo užíváním určitých léčivých přípravků (zejména estrogenů, barbiturátů a steroidů), protože tyto přípravky jsou schopny nepřímo indukovat aktivitu syntetázy kyseliny delta-aminolevulové prostřednictvím zvýšených požadavků jater na hem. Protože naředěný roztok je hypertonický, musí být podáván pouze velmi pomalou intravenózní infuzí. Aby se zabránilo podráždění žíly, je nutné podávat infuzi po dobu alespoň 30 minut do velké žíly na předloktí nebo do centrální žíly. Po podání přípravku Normosang může v žíle použité pro transfuzi dojít k žilní trombóze. Několik případů popisuje trombózu dutých žil a jejich hlavních přítoků (kyčelních a podklíčkových žil). Riziko trombózy dutých žil nelze vyloučit. Po opakovaných infuzích byly hlášeny změny periferních žil, které mohou zabránit použití postižených žil pro podávání dalších infuzí, což vyžaduje použití centrální žilní linky. Proto se doporučuje po infuzi propláchnout žílu 100 ml 0,9% NaCl. Po opakovaných infuzích byly hlášeny zvýšené koncentrace sérového feritinu. Proto se doporučuje, aby byl sérový feritin měřen v pravidelných intervalech pro monitorování zásob železa v organismu. Pokud je to zapotřebí, je nutné provést další vyšetřovací metody a učinit terapeutická opatření. Tmavá barva přípravku Normosang může propůjčit plazmě neobvyklé zbarvení. Mezi standardní opatření k zamezení infekcí z léčivých přípravků připravených z lidské krve nebo plazmy patří selekce dárců, vyšetření darovaných krevních dávek na specifické markery infekcí a účinné kroky k inaktivaci a odstranění virů při výrobě. Navzdory tomu nelze při podávání léčivých přípravků tohoto typu přenos infekčních zárodků vyloučit. To také platí pro neznámé nebo nově vznikající viry a jiné patogeny. Uvedená opatření jsou považována za účinná k prevenci obalených virů, například HIV, HBV a HCV. Důrazně doporučujeme při každém podání přípravku Normosang pacientovi zaznamenat název a č. šarže výrobku, aby tak bylo možno dohledat, jaká šarže byla komu podána. Normosang obsahuje 1 g etanolu (96 %) na 10 ml ampulku. To může být škodlivé pro osoby trpící onemocněním jater, alkoholismem, epilepsií, poškozením mozku, a také pro těhotné ženy a děti. Obsah ethanolu v přípravku Normosang může modifikovat nebo zvýšit účinek dalších léčiv. Normosang by neměl být použit jako preventivní léčba, protože dostupné údaje jsou příliš omezené a dlouhodobé podávání pravidelných infuzí nese riziko přetížení železem (viz bod 4.8. Nežádoucí účinky). Jako doplněk léčby přípravkem Normosang a jiných nezbytných opatření, jako je eliminace vyvolávajících faktorů, se doporučuje zajistit dostatečný přísun sacharidů. 4.5. **Interakce s jinými léčivými přípravky a jiné formy interakce** Během léčby přípravkem Normosang se zvyšuje enzymová aktivita enzymů P450. Metabolismus současně podávaných léků, které jsou metabolizovány cytochromovými enzymy P450 (jako například estrogeny, barbituráty a steroidy), se může během podávání přípravku Normosang zvýšit, což vede k nižší systémové expozici. 4.6. **Fertilita, těhotenství a kojení** Specifická experimentální a klinická data nejsou dispozici, a proto rizika během těhotenství nejsou definována; nicméně doposud nebyly pozorovány u novorozenců, jejichž matky byly léčeny přípravkem Normosang během těhotenství, žádné následky. Účinky přípravku Normosang nebyly ověřovány během kojení. Ale protože je do mateřského mléka vylučováno mnoho látek, je při podávání přípravku Normosang během kojení vhodné dodržovat opatrnost. Pro omezené údaje není možná doporučit podávání přípravku Normosang během těhotenství a kojení, pokud to není nezbytně nutné. 4.7. **Účinky na schopnost řídit a obsluhovat stroje** Neexistuje žádný důkaz, který svědčí pro to, že Normosang nepříznivě ovlivňuje schopnost řídit nebo obsluhovat stroje. 4.8. **Nežádoucí účinky** Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou reakce v místě infuze, které se objevují zejména tehdy, jestliže se infuze podává do žil, které jsou příliš malé (viz bod 4.4. Zvláštní upozornění a opatření pro použití). Hlášené nežádoucí účinky jsou uvedeny níže podle třídy orgánových systémů a podle frekvence. Frekvence jsou vyjádřeny takto: velmi časté (≥1/10časté (≥1/100 až <1/10), méně časté (≥1/1000 až <1/100), vzácné (≥1/10000 až < 1/1000), Velmi vzácné (<1/10000), není známo (z dostupných údajů nelze určit). **Poruchy imunitního systému** *Vzácné:* anafylaktoidní reakce, přecitlivělost (jako například dermatitis medicamentosa a edém jazyka). **Poruchy nervového systému:** Četnost neznámá: bolesti hlavy. **Pévní poruchy** *Velmi časté:* Spatný žilní přístup. *Četnost neznámá:* Trombóza v místě vpichu, žilní trombóza. **Celkové poruchy a reakce v místě aplikace** Časté: flebitida v místě infuze, bolest v místě infuze, otok v místě infuze, *Vzácné:* pyrexie. **Vyšetření** *Méně časté:* zvýšený sérový feritin. Po několika letech léčby opakovanými infuzemi byly hlášeny zvýšené koncentrace sérového feritinu, což může ukazovat na přetížení železem (viz bod 4.4. Zvláštní upozornění a opatření pro použití). *Hlášení podezření na nežádoucí účinky* Hlášení podezření na nežádoucí účinky po registraci léčivého přípravku je důležité. Umožňuje to pokračovat ve sledování poměru přínosů a rizik léčivého přípravku. Žádáme zdravotnické pracovníky, aby hlásili podezření na nežádoucí účinky prostřednictvím národního systému hlášení nežádoucích účinků na adrese: Státní ústav pro kontrolu léčiv, Oddělení farmakovigilance, Šrobárova 48, 100 41 Praha 10, tel.: +420 272 185 885, Fax: +420 272 185 222, Email: farmakovigilance@sukl.cz. Webové stránky: www.sukl.cz/nahlasit-nezadouci-ucinek 4.9. **Předávkování** V pokusech na zvířatech s přípravkem Normosang byly akutní toxické účinky po podávání vysokých dávek namířeny proti játrům. Celkové dávky desetkrát vyšší než dávky doporučované pro podávání u člověka také snížily krevní tlak laboratorních potkanů. Vysoké dávky mohou způsobit poruchy hemostázy. Normosang obsahuje 4000 mg propylenglykolu (na ampulku o objemu 10 ml). Propylenglykol ve vysokých dávkách může vyvolat nežádoucí účinky na centrální nervový systém, laktátovou acidózu, renální a hepatální toxicitu, zvýšení osmolarity plazmy a hemolytické reakce. Byly hlášeny případy předávkování přípravkem Normosang. Například jeden pacient zaznamenal slabé zvracení, bolest a citlivost předloktí (na místě infuze) a jeho uzdravování probíhalo bez komplikací. Jiný pacient, kterému bylo podáno 10 ampulek přípravku Normosang (2500 mg lidského heminu) v jediné infuzi, zaznamenal fulminantní selhání jater, u dalšího pacienta s dřívějšími záznamy chronického selhání jater, kterému byly podány 4 ampulky přípravku Normosang (1000 mg lidského heminu) nastalo akutní selhání jater s nutnou transplantací jater. Jeden pacient dostával 12 ampulek přípravku Normosang (3000 mg lidského heminu) během dvou dnů, což mělo za následek hyperbilirubinémii, anémii a generalizovanou hemoragickou diatézu. Účinky přetrvávaly několik dnů po podávání, ale pacient se poté zotavil bez následků. Bylo také Hlášeno, že vysoká dávka (1000 mg) hematinu, jiné formy hemu, vyvolala u jednoho pacienta přechodné renální selhání. Je nutné pečlivě monitorovat parametry krevní koagulace, hepatální, renální a pankreatické funkce až do jejich normalizace. Je třeba také provádět kardiovaskulární monitorování (možnost arytmií). Léčebná opatření - Pro vazbu volně cirkulujícího a potenciálně reaktivního heminu se mají podávat infuze albuminu. - Podávání aktivního uhlí umožní přerušit enterohepatální oběh hemu. - Pro eliminaci propylenglykolu je nutná hemodialýza. **5. FARMAKOLOGICKÉ VLASTNOSTI** 5.1. **Farmakodynamické vlastnosti** Farmakoterapeutická skupina: jiné hematologické přípravky, ATC kód: B06AB. Hem-arginát je indikován u jaterních porfyrií (akutní intermitentní porfyrie, porphyria variegata a hereditární koproporfyrie). Tyto porfyrie jsou charakterizovány výskytem enzymatického bloku v dráze biosyntézy hemu, což má za následek: 1) deficit hemu nezbytného pro syntézu různých hemoproteinů. 2) hlavně akumulaci prekurzorů hemu před metabolickým blokem, tyto prekurzory jsou pro organismus přímo nebo nepřímo toxické. Podávání heminu snížením jeho deficitu potlačuje zpětnou vazbu aktivitu syntetázy delta-aminolevulové kyseliny (klíčového enzymu v syntéze porfyrinů), což snižuje produkci porfyrinů a toxických prekurzorů hemu. Proto tedy přispěním k znovunastolení normálních hladin hemoproteinů a respiračních pigmentů koriguje hem biologické poruchy pozorované u pacientů s porfyrií. Protože biologická dostupnost hem-arginátu je srovnatelná s dostupností methemalbuminu, přirozené formy transportu hemu, je toto účinné jak během remise, tak během akutního záchvatu. V obou případech, ale obzvláště během akutního záchvatu, je pravděpodobné, že infuze heminu upraví močové vylučování kyseliny delta-aminolevulové a porfobilinogenu, dvou hlavních prekurzorů, jejichž akumulace je charakteristickým rysem onemocnění. Toto platí jak pro akutní intermitentní porfyrii tak pro porphyria variegata. Na rozdíl od starších galenických přípravků infuze hem-arginátu nevyvolávají u zdravých dobrovolníků žádné závažné změny v parametrech koagulace a fibrinolýzy. Bylo prokázáno, že všechny tyto parametry zůstávají nezměněné s výjimkou koncentrací faktorů IX a X, které dočasně poklesly o 10 až 15 %. **5.2. Farmakokinetické vlastnosti** Po intravenózní infuzi heminu (3 mg/kg) byly farmakokinetické parametry (průměr ± SD) pozorované u zdravých dobrovolníků a pacientů s porfyrií následující: $C_{(0)}$ 60,0 ± 17 µg/ml Eliminační poločas (t½) 10,8 ± 1,6 hodin Celková plazmatická clearance 3,7 ± 1,2 ml/min Distribuční objem 3,4 ± 0,9 l Po opakovaných infuzích se poločas hemu v organismu zvyšuje; po 4. infuzi se prodlouží na 18,1 hodiny. **5.3. Předklinické údaje vztahující se k bezpečnosti** Neklinické údaje získané na základě farmakologických studií bezpečnosti, toxicity po jednorázovém a opakovaném podávání, mutagenicity a imunogenity neodhalily žádné zvláštní riziko pro člověka. Protože přípravek Normosang je lidského původu, nemá smysl provádět neklinické studie s dlouhodobou léčbou, proto tedy kancerogenní potenciál a reprodukční toxicita nebyly zkoumány. **6. FARMACEUTICKÉ ÚDAJE** 6.1. **Seznam pomocných látek** Arginin, 96% ethanol, propylenglykol, voda na injekce. 6.2. **Inkompatibility** Tento léčivý přípravek nesmí být mísen s jinými léčivými přípravky s výjimkou těch, které jsou uvedeny v bodě 6.6. 6.3. **Doba použitelnosti** 2 roky. Po naředění roztok použijte do 1 hodiny. 6.4. **Zvláštní opatření pro uchovávání** Uchovávejte v chladničce (2 °C - 8 °C). Uchovávejte ampulku v krabičce, aby byl přípravek chráněn před světlem. Podmínky uchovávání tohoto léčivého přípravku po jeho naředění jsou uvedeny v bodě 6.3. 6.5. **Druh obalu a velikost balení** 10 ml roztoku v ampulce (skleněná, typ I) - balení po 4 ks. 6.6. **Zvláštní opatření pro likvidaci přípravku** *Příprava roztoku* Normosang, poskytovaný v ampulkách, se má naředit bezprostředně před podáváním ve 100 ml 0,9% roztoku NaCl ve skleněné lahvi; požadované množství přípravku, vypočtené podle hmotnosti pacienta, je přeneseno z ampulky do skleněné lahve. Ředění se má připravit ve skleněné lahvi, protože v plastové nádobě z PVC je degradace heminu poněkud rychlejší. Nepřipravujte více než jednu ampulku denně. Roztok má být použit během jedné hodiny po naředění. Protože roztok přípravku Normosang je tmavě zbarvený dokonce i po naředění, je obtížné vizuálně ověřit nepřítomnost částic v suspenzi. Doporučuje se proto používat infuzní soupravu s filtrem. Veškerý nepoužitý léčivý přípravek nebo odpad musí být zlikvidován v souladu s místními požadavky. **7. DRŽITEL ROZHODNUTÍ O REGISTRACI** Orphan Europe, Immeuble «Le Wilson», 70 avenue du Général de Gaulle, F-92800 Puteaux, Francie **8. REGISTRAČNÍ ČÍSLO(A)** 80/271/06-C **9. DATUM PRVNÍ REGISTRACE/PRODLOUŽENÍ REGISTRACE** Datum první registrace: 26. 7. 2006 Datum posledního prodloužení registrace: 5. 5. 2009 **10. DATUM REVIZE TEXTU** 4. 12. 2013

Výdej léčivého přípravku je vázaný na lékařský předpis. Každá oprávněná žádost lékaře o tento léčivý přípravek je hrazena ze zdravotního pojištění. Aktuální informace o výši úhrady ze zdravotního pojištění naleznete na www.mzcr.cz nebo u konkrétní zdravotní pojišťovny.

Další informace o tomto přípravku získáte u místního zástupce pro Českou republiku na telefonním čísle: +420 702 211 762, nebo prostřednictvím mailboxu: infoczechia@orphan-europe.com.

Jakékoliv podezření na závažný nebo neočekávaný nežádoucí účinek a jiné skutečnosti závažné pro zdraví léčených osob nahlaste na farmakovigilanční oddělení OrphanEurope do mailboxu: **pvczechia@orphan-europe.com**, tel.: +420 469 689 041, nebo pro- střednictvím národního systému hlášení nežádoucích účinků na adresu: Státní ústav pro kontrolu léčiv, Oddělení farmakovigilance, Šrobárova 48, 100 41 Praha 10, Tel.: +420 272 185 885, Fax: +420 272 185 222, Email: **farmakovigilance@sukl.cz**. Hlášení je možné zasílat pomocí tištěného nebo elektronického formuláře dostupného na webových stránkách SÚKL, vše potřebné najdete na: **www.sukl.cz/nahlasit-nezadouci-ucinek**.

ORPHAN EUROPE

RECORDATI GROUP

LITERATURA:

1. Hift R The acute porphyrias. European Gastroenterology & Hepatology. Volume 8 Issue 1 Spring 2012.
2. Normosang® Summary of Product Characteristics.
3. Nordmann et al. The Porphyrias. Journal of Hepatology 1999; 30:12-16.
4. Puy H et al. Porphyrias. Lancet 2010; 13:924-937.
5. Siegesmund M et al. The acute hepatic porphyrias: Current status and future challenges. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2010; 24:593-605.
6. Ventura P et al. The acute porphyrias: a diagnostic and therapeutic challenge in internal and emergency medicine. Intern Emerg Med (2009) 4:297-308.

Tomáš Honzík, Jiří Zeman a kol.
Dědičné poruchy metabolismu v kazuistikách

Šéfredaktorka Šárka Mašková
Jazyková a redakční úprava Martin Čermák
Kresba na titulní straně Tereza Čechová
Obálka Renata Brtnická
Sazba Jan Štěpánek
Tisk Těšínská tiskárna, a. s.

Ředitel divize Medical Services Karel Novotný
Vydalo nakladatelství Mladá fronta a. s.
jako svou 9274. publikaci.
První vydání. Praha 2016
ISBN 978-80-204-4187-4

Knihy Mladé fronty si můžete objednat na adrese:
Mladá fronta a. s., divize Medical Services
Mezi Vodami 1952/9, 143 00 Praha 4 – Modřany
na internetu: www.kniha.cz
Pro objednání na Slovensku: www.medical-services.sk

Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2

Prohlášení zájemce o nahlédnutí do závěrečné práce absolventa studijního programu uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům, ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámen/a se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	**Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)**	**Signatura závěrečné práce**	**Datum**	**Podpis**