

DEFICIENCIJA FENILALANIN HIDROKSILAZE: OD KLINIČKE SLIKE DO MODERNOG PRISTUPA GENETIČKOM TESTIRANJU

Dejhalla, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:499381>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Ema Dejhalla

DEFICIJENCIJA FENILALANIN HIDROKSILAZE: OD KLINIČKE SLIKE
DO MODERNOG PRISTUPA GENETIČKOM TESTIRANJU

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI
SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINE

Ema Dejhalla

DEFICIJENCIJA FENILALANIN HIDROKSILAZE: OD KLINIČKE SLIKE
DO MODERNOG PRISTUPA GENETIČKOM TESTIRANJU

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Nina Pereza, dr. med.

Diplomski rad ocjenjen je dana 10. lipnja 2020. godine u/na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci,

pred povjerenstvom u sastavu:

1. doc. dr. sc. Sergej Nadalin

2. prof. dr. sc. Smiljana Ristić

3. prof. dr. sc. Saša Ostojić

Rad sadrži 23 stranice i 32 literaturna navoda.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Svaha rada	1
3. Deficijencija fenilalanin hidroksilaze.....	1
3.1. Povijesni pregled	1
3.2. Epidemiologija.....	2
3.3. Genetička etiologija	2
3.4. Patofiziologija.....	3
3.5. Klinička slika	3
3.6. Genetičko testiranje	6
3.6.1. Novorođenački probir.....	6
3.6.2. Dijagnostičko testiranje i određivanje statusa nositelja	7
3.7. Terapija.....	7
3.7.1. Prehrana	8
3.7.2. Sapropterin	9
3.7.3. Transporteri velikih neutralnih aminokiselina	9
3.7.4. Nove terapijske metode.....	9
3.7.4.1. Fenilalanin-amonij-lijaza	10
3.7.4.2. Transplantacija hepatocita.....	10
3.8. Deficijencija fenilalanin hidroksilaze u trudnoći	10
4. Moderni pristup genetičkom testiranju	11
5. Rasprava	13
6. Zaključci.....	16
7. Sažetak	17
8. Summary	18
9. Literatura	19
10. Životopis.....	23

Popis skraćenica i akronima

PAH - fenilalanin hidroksilaza (*engl. phenylalanine hydroxylase*)

BH4 - tetrahidrobiopterin (*engl. tetrahydrobiopterin*)

HMG-CoA - hidroksimetil glutaril koenzim A (*engl. Hydroxymethyl Glutaryl Coenzyme A*)

PAL - fenilalanin-amonij-lijaza (*engl. phenylalanine ammonia lyase*)

IQ - kvocijent inteligencije (*engl. intelligence quotient*)

MLPA - *engl. multiplex ligation-dependent probe amplification*

PCR - *engl. polymerase chain reaction*

1. Uvod

Deficijencija PAH-a je autosomno recesivni metabolički poremećaj karakteriziran povećanim koncentracijama aminokiseline fenilalanina u krvi te fenilpiruvične kiseline u mokraći (1). Uzrokovana je (vjerojatno) patogenim varijantama sekvence PAH gena, koji kodira istoimeni enzim zadužen za pretvorbu aminokiseline fenilalanina u tirozin. Za pretvorbu fenilalanina u tirozin potreban je i kofaktor BH₄ pa njegov manjak također može uzrokovati povišene vrijednosti fenilalanina u krvi. Neliječena deficijencija PAH-a manifestira se intelektualnim zaostajanjem, konvulzijama, hiperaktivnošću, mikrocefalijom i ekcematoznim osipom (2).

Provođenjem novorođenačkog probira na deficijenciju PAH-a te napretkom u dijagnostičkom genetičkom testiranju, omogućena je brza dijagnostika te posljedično tome, prevencija manifestacije kliničkih obilježja ove bolesti (1).

2. Svrha rada

Cilj rada je opisati mogućnosti novorođenačkog probira i genetičkog testiranja u svrhu što ranije dijagnostike deficijencije PAH-a, ali i istaknuti važnost prepoznavanja kliničkih obilježja te modernog pristupa genetičkom testiranju kojim se otkrivaju nositelji autosomno recesivnih bolesti.

3. Deficijencija fenilalanin hidroksilaze

3.1. Povijesni pregled

Godine 1934., u urinu dva intelektualno zaostala djeteta, liječnik i biokemičar Asbjørn Følling dokazao je fenilpiruvičnu kiselinu (3). Ta tvar je također kasnije pronađena u urinu osam intelektualno zaostalih pacijenata. Temeljem tih istraživanja, *oligophrenia phenylpyrouvia*, kasnije nazvana deficijencija PAH-a, opisana je kao poremećaj metabolizma. Følling je kasnije također utvrdio obrazac autosomno recesivnog naslijeđivanja, pretpostavljajući da je

uzrok bolesti poremećaj u metabolizmu fenilalanina (3). Prvo spominjanje deficijencije PAH-a u Republici Hrvatskoj potječe s početka šezdesetih godina prošlog stoljeća, kada je riječki pedijatar Miro Juretić prepoznao i potvrdio bolest u jednog djeteta (4).

3.2. Epidemiologija

Prevalencija deficijencije PAH-a ovisi o geografskom položaju. Smatra se da se javlja u 1-5/10 000 živorođene djece u Europi s povećanom pojavnosti u nekim državama (npr. Irska, Italija). Prevalencija je visoka u Turskoj i iznosi 1/4 000 živorođene djece. Javlja se rijetko u Finskoj, Africi i Japanu (5). U Hrvatskoj je incidencija svih hiperfenilalaninemija oko 1:83 200, najviša je u Hrvatskom Zagorju, a najniža u Dalmaciji (6).

3.3. Genetička etiologija

Deficijencija PAH-a se nasljeđuje autosomno recesivno. Gen za enzim PAH nalazi se na kromosomu 12q23.2, veličine je oko 171 kb i sadrži 13 egzona (7). Enzim PAH pretvara aminokiselinu fenilalanin u tirozin. Vjerojatno patogene i patogene varijante sekvence u obje kopije gena PAH uzrokuju smanjenu aktivnost ili inaktivaciju enzima te se u organizmu povećavaju koncentracije fenilalanina i fenilpiruvične kiseline. U većini slučajeva radi se o supstitucijama i to po tipu *missense*.

Korelacija genotip-fenotip je jako varijabilna. U nekim slučajevima, mutacije PAH gena rezultiraju umjerenim formama deficijencije PAH-a, što se naziva hiperfenilalaninemija. Kod složenih heterozigota s funkcionalnom hemizigotnošću, manje ozbiljna patogena varijanta sekvence PAH-a određuje težinu bolesti (8). Međutim, kada su prisutne dvije patogene varijante sekvence povezane sa sličnom ozbiljnošću, fenotip može biti blaži nego što bi bio gledajući samo jedan alel (8). Korelacija genotipa i fenotipa postaje složenija kada se uzmu u obzir i klinički ishodi. Iako su DiSilvestre i suradnici utvrdili da genotip predviđa biokemijski fenotip,

on ne predviđa uvijek klinički fenotip. Neki neliječeni pojedinci s nedostatkom PAH-a i bialelnim patogenim varijantama PAH-a koje obično rezultiraju klasičnom fenilketonurijom, imaju povišenu koncentraciju fenilalanina u plazmi, ali normalnu inteligenciju. Također, neki srodnici s istim genotipom imaju različite kliničke i metaboličke fenotipe (1). Osim PAH-a, za pretvorbu fenilalanina u tirozin, potreban je kofaktor BH₄ te i njegova deficijencija može uzrokovati povišene koncentracije fenilalanina u krvi. Osobe s mutacijom na jednom od dva alela, nosioci su bolesti i nemaju laboratorijske i klinički manifestne karakteristike deficijencije PAH-a (2).

3.4. Patofiziologija

Kao rezultat povišene razine i nakupljanja, fenilalanin prelazi krvno-moždanu barijeru te nepovoljno djeluje na razvoj i funkciju mozga (9). Transporteri velikih neutralnih L-aminokiselina prenose fenilalanin kroz krvno-moždanu barijeru. Uz fenilalanin, prenose tirozin, prekursor dopamina i noradrenalina te prekursor serotonina triptofan. Zbog visokih koncentracija fenilalanina, onemogućen je ulazak tirozina i triptofana u mozak, što dovodi do smanjene sinteze proteina i neurotransmitora. Osim toga, zbog povećane koncentracije fenilalanina, smatra se da dolazi do smanjenja glutaminičnog transmissijskog, piruvat-kinazne aktivnosti, aktivnosti HMG-CoA reduktaze te oštećenja mijelina (9).

3.5. Klinička slika

Deficijencija PAH-a dovodi do netolerancije na prehrambeni unos esencijalne aminokiseline fenilalanina, stvarajući time široki spektar poremećaja. Rizik od nepovoljnog ishoda varira ovisno o stupnju deficijencije PAH-a. Bez učinkovite terapije, većina pojedinaca s ozbiljnim nedostatkom PAH-a, poznatim kao klasična fenilketonurija, razvija nepovratan intelektualni poremećaj (1).

Neliječene osobe s **klasičnom fenilketonurijom** gotovo uvijek pokazuju oštećenje mozga (10). Većina pojedinaca s potpunim nedostatkom enzima, imaju koncentracije fenilalanina veće od 1200 $\mu\text{mol/L}$. Znakovi i simptomi uključuju ozbiljan intelektualni poremećaj i probleme u ponašanju s velikom učestalošću epileptičnih napadaja i varijabilnom mikrocefalijom (11). Izlučivanje prekomjernog fenilalanina i njegovih metabolita može stvoriti zagasiti tjelesni miris i stanja kože kao što je ekcem. Povezana inhibicija tirozinaze i niska koncentracija tirozina odgovorni su za smanjenu pigmentaciju kože i kose. Oboljeli pojedinci također imaju smanjeno stvaranje mijelina, što na kraju dovodi do promjena bijele tvari vidljive na magnetskoj rezonanci mozga (12). Značajno povišene razine fenilalanina smanjuju proizvodnju dopamina, norepinefrina i serotonina i mogu se odraziti na elektroencefalografskim promjenama koje su reverzibilne ako se smanji koncentracija fenilalanina. Povezanost između rano povišene razine fenilalanina i dugoročnog smanjenja IQ-a dobro je proučena (13). Povoljno djelovanje normaliziranih koncentracija fenilalanina na IQ tijekom života također je prikazano u studijama oboljelih odraslih osoba. Pojedinci koji ne provode kontroliranu dijetu, u odrasloj dobi imaju mali pad IQ-a (14). Međutim, čak i uz strogo pridržavanje dijete s niskim fenilalaninom, odrasli pojedinci mogu i dalje imati neke suboptimalne kognitivne ishode koji utječu na jezične vještine, pamćenje, vještine učenja i izvršnu funkciju. Javljaju se tendencija smanjenog trajanja pozornosti, spora sposobnost obrade informacija i spora motorička aktivnost. Kod rano liječenih osoba koje su prekinule terapiju u drugom desetljeću života, veća je učestalost anksioznosti, depresije, fobija i napadaja. Također, postoji mogućnost pojave neuroloških abnormalnosti, poput tremora i pojačanih refleksa te u nekim slučajevima i težih neuroloških disfunkcija, uključujući paralizu. Ponovno uvođenje kontrolirane dijete često uklanja navedene neurološke simptome (14).

Ne postoji dovoljno istraživanja na **pojedincima s manjkom PAH-a i koncentracijom fenilalanina u plazmi između 600 i 1200 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (10-20 mg / dL)** koji ne provode kontroliranu dijetu, međutim, smatra se da takvi pojedinci s klasičnom fenilketonurijom imaju

akutne i kronične neuropsihološke probleme. Stoga, osobama s koncentracijama fenilalanina u navedenom rasponu, preporučuje se tretman kontroliranom dijetom (1).

Mnogi stručnjaci smatraju da **osobe s nedostatkom PAH-a koji stalno imaju koncentraciju fenilalanina u plazmi ispod 600 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (10 mg / dL)**, a ne provode kontroliranu dijetu, nisu izloženi većem riziku razvoja intelektualnog, neurološkog i neuropsihološkog oštećenja u odnosu na osobe koje nemaju nedostatak PAH-a. Međutim, budući da postoje dokazi koji upućuju na to da pojedinci s klasičnom fenilketonurijom imaju vidljive neurofiziološke promjene kada su razine fenilalanina između 360 i 600 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (6 do 10 mg / dL), s druge strane, preporučuje se ograničenje prehrane za svakog pojedinca koji ima razinu fenilalanina iznad 360 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (6 mg / dL), a provodio je nekontroliranu dijetu. Vrlo mali broj programa započinje s terapijom kod pojedinaca s razinom fenilalanina iznad 240 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (4 mg / dL) (1).

Nedostatak fenilalanina dovodi do ograničenja rasta, mikrocefalije i problema s razvojem. U nekoliko slučajeva, neliječenim osobama s blagim nedostatkom PAH-a, koje su imale normalnu inteligenciju, dijagnosticirana je deficijencija PAH-a u odrasloj dobi kao rezultat naglog psihijatrijskog pogoršanja (10). Brojne studije pokazuju da pojedinci s manjkom PAH-a imaju visoku učestalost osteopenije. U tijeku su studije istraživanja mehanizma male koštane gustoće i kliničkog značaja. Sve dok se ne provedu dodatne studije, važno je nastaviti pomno nadzirati stanje koštanog sustava osoba koje imaju nedostatak PAH-a (15).

Kod pojedinaca koji prestanu provoditi kontroliranu dijetu u adolescenciji, može se pojaviti manjak vitamina B12 (16).

Kod djece majki s visokom razinom fenilalanina, pojavljuje se intelektualna zaostalost, mikrocefalija, kongenitalne srčane bolesti, a tijekom trudnoće uočen je zastoj u rastu (6).

3.6. Genetičko testiranje

Sumnja na deficijenciju PAH-a postavlja se kod pojedinaca s pozitivnim testom novorođenačkog probira ili karakterističnom kliničkom slikom, karakterističnim nalazom slikovnih metoda neurološkog sustava i karakterističnim laboratorijskim nalazima (17). Također, na deficijenciju PAH-a sumnja se kod žena koje u anamnezi imaju ponavljajuće spontane pobačaje s malformacijama ploda kao što su mikrocefalija, malformacije mozga, kongenitalne bolesti srca, malformacije udova ili traheozofagealna fistula (17). U 90% pojedinaca s deficijencijom PAH-a, na magnetskoj rezonanci mozga, nađena je progresivna bolest bijele tvari, bez neurološkog pogoršanja (12). Kod neliječenih pojedinaca, koncentracije fenilalanina u plazmi trajno su iznad 2 mg/dL, s koncentracijama fenilalanina većim od koncentracija tirozina. Normalan omjer fenilalanina i tirozina manji je od 1, dok se omjer veći od 3 smatra znakom deficijencije PAH-a. Gotovo svi pojedinci s potpunim nedostatkom enzima, imaju koncentracije fenilalanina veće od 1200 $\mu\text{mol/L}$ (1). Ukoliko se bolest dijagnosticira rano i započne s liječenjem, kod oboljelih se ne dosegnu navedene koncentracije. U Republici Hrvatskoj, provodi se novorođenački probir koji uključuje probir na deficijenciju PAH-a. Ukoliko je rezultat probira pozitivan, provodi se dijagnostičko testiranje novorođenčeta te određivanje statusa nositelja roditelja (1).

3.6.1. Novorođenački probir

Cilj probira u populaciji je otkrivanje genetičkih poremećaja čiji se simptomi i znakovi pravovremenom intervencijom mogu odgoditi, spriječiti ili liječiti. Probir može biti nereproduktivni i reproduktivni (18). Novorođenački probir pripada skupini nereproduktivnog probira. U Republici Hrvatskoj od kraja 2017. godine provodi se prošireni novorođenački probir tehnologijom tandemске spektrometrije masa, koji uključuje i probir na deficijenciju PAH-a. Probir se provodi iz suhe kapi krvi u dobi između 48 i 72 sata dobi djeteta (19).

3.6.2. Dijagnostičko testiranje i određivanje statusa nositelja

Ukoliko je koncentracija fenilalanina veća od 120 $\mu\text{mol/L}$ (2mg/dL), test probira smatra se pozitivan te se provodi dijagnostičko testiranje. Pristup molekularnom ispitivanju može uključivati testiranje jednog gena ili upotrebu multigenkih panela (1).

Patogene varijante sekvence u 97-99% slučajeva uključuju supstitucije, insercije, delecije pa se primjenjuju sveobuhvatne metode, tj. sekvenciranje sljedeće generacije. Ukoliko postoje populacijske varijante, primjenjuje se Sanger metoda. U 1-3% slučajeva javljaju se delecija ili duplikacija gena za PAH te se tada primjenjuje MLPA, čime se otkrivaju intragenske i genske delecije i duplikacije. MLPA test je vrsta PCR metode (1).

Nakon dijagnosticiranja bolesti u probanda, provodi se određivanje statusa nositelja kod srodnika, najčešće Sanger metodom, radi utvrđivanja recesivnih genskih mutacija u heterozigotnom obliku, informiranja o rizicima za potomstvo i donošenja daljnjih reproduktivnih odluka. Rizik za autosomno recesivnu bolest iznosi 25 % ako su oba partnera nositelji. (1).

3.7. Terapija

U liječenju oboljelih pojedinaca svih dobnih skupina potrebno je sudjelovanje multidisciplinarnog tima koji se sastoji od liječnika, nutricionista, medicinskih genetičara, socijalnih radnika, medicinskih sestara i psihologa (20).

Mnogi stručnjaci smatraju da je liječenje neklasične hiperfenilalaninemije kod većine pojedinaca nepotrebno. Međutim, kod oboljelih s koncentracijama fenilalanina većim od 600 $\mu\text{mol / L}$ (10 mg / dL) najčešće se liječenje provodi. Liječenje kod pojedinaca s razinom fenilalanina trajno nižom od 600 $\mu\text{mol / L}$, ali većom od 360 $\mu\text{mol / L}$ ostaje sporno. Uočeno je da je trideset i jedna osoba s nedostatkom PAH-a koja nikada nije liječena i čija koncentracija fenilalanina u plazmi nije prelazila 600 $\mu\text{mol / L}$, imala normalan kognitivni

neuropsihološki razvoj (1). Ako koncentracija fenilalanina ostane između 120 i 360 $\mu\text{mol} / \text{L}$, liječenje se ne preporučuje, no, kod djece treba pomno pratiti razine fenilalanina u plazmi tijekom prve dvije godine života, zatim na godišnjoj ili dvogodišnjoj osnovi. Potrebno je paziti da žene generativne dobi u ovoj skupini dobiju odgovarajuće savjetovanje o teratogenim učincima povišene koncentracije fenilalanina u majčinoj krvi na plod (1).

3.7.1. Prehrana

Osnovna metoda liječenja klasične fenilketonurije je ograničenje prehrambenog unosa fenilalanina (21). Općenito prihvaćeni cilj liječenja osoba s nedostatkom PAH-a je normalizacija koncentracije fenilalanina i tirozina u krvi i na taj način sprječavanje kognitivnog deficita (21). Koncentracije fenilalanina u krvi trebaju se kretati između 120 i 360 $\mu\text{mol} / \text{L}$ tijekom cijelog životnog vijeka te koncentracije treba pratiti najčešće tijekom razdoblja pojačanog anabolizma kao što je novorođenačka dob, djetinjstvo i trudnoća (1). U prehranu dojenčeta s nedostatkom PAH-a uključeno je majčino mlijeko. Preporučuje se mjerenje koncentracije fenilalanina u krvi jednom tjedno tijekom prve godine života, jednom u dva tjedna do dobi od 13 godina, a nakon toga jednom mjesečno. Mjerenja se provode po mogućnosti dva do tri sata nakon jela. Osim toga, potrebno je izbjegavati duga razdoblja niske koncentracije fenilalanina u krvi, koja je također štetna za razvoj i funkciju mozga. Kako bi se postigle koncentracije fenilalanina unutra referentnih vrijednosti, procjenjuju se individualne prehrambene potrebe, sposobnost pridržavanja preporuka i pristup mogućnostima liječenja (1).

Unos fenilalanina prati se jednom od sljedećih metoda: brojenjem miligrama, izmjenom fenilalanina ili grama proteina. Krvni tlak potrebno je održavati u normalnim granicama.

Veoma je važno osigurati savjetovanje i obrazovanje specifično za potrebe pojedinca s nedostatkom PAH-a i/ili njegovog njegovatelja kako bi se održale koncentracije fenilalanina

u krvi tijekom cijelog životnog vijeka (1).

3.7.2. Sapropterin

Uz kontroliranu dijetu, metoda liječenja hiperfenilalaninemije kod odraslih i pedijatrijskih bolesnika s deficijencijom PAH-a ili nedostatkom BH4 je primjena lijeka sapropterina (22). Kod pojedinaca s deficijencijom PAH-a, početna doza je 10 mg/kg tjelesne težine, jednom dnevno. Radi održavanja odgovarajućih koncentracija fenilalanina u krvi, doza sapropterina se prilagođava između 5 i 20 mg/kg/dnevno. Kod pojedinaca s nedostatkom BH4, početna doza lijeka je 2-5 mg/kg/dnevno tjelesne težine. Doza se može prilagoditi do maksimalno 20 mg/dnevno. Oboljeli pojedinci s blažim patogenim varijantama PAH-a imaju bolji odgovor na sapropterin. Nema dovoljno podataka o primjeni lijeka tijekom trudnoće. Lijek se ne bi trebao primjenjivati tijekom dojenja (22).

3.7.3. Transporteri velikih neutralnih aminokiselina

U liječenju se mogu koristiti i transporteri velikih neutralnih aminokiselina (23). Smanjuju koncentraciju fenilalanina u adolescenata i odraslih osoba, međutim, ne smiju se primjenjivati kod žena reproduktivne dobi (24).

3.7.4. Nove terapijske metode

Iako je liječenje deficijencije PAH-a kontroliranom dijetom s ograničenim unosom fenilalanina izuzetno uspješno, neugodan okus hrane rezultira lošom provedbom kontrolirane dijetete u adolescenciji i odrasloj dobi te su u tijeku istraživanja novih načina liječenja (1).

3.7.4.1. Fenilalanin-amonij-lijaza

Proučava se primjena enzima PAL, biljnog enzima koji pretvara fenilalanin u trans-cimetnu kiselinu i amonijak. Trenutno se istražuje pegilacija, tj. konjugacija PAL-a s polietilen glikolom. Otkriveno je da se time smanjuje imunološki odgovor na PAL. Rezultati ispitivanja prve faze pokazali su djelotvornost smanjivanjem fenilalanina u krvi za 54% u sudionika koji su primali najveću dozu. Nuspojave su uključivale osip, nastanak antitijela na PAL i na komponentu pegilacije te reakciju na mjestu ubrizgavanja (25).

3.7.4.2. Transplantacija hepatocita

Također, ispituje se repopulacija jetre stanicama koje eksprimiraju PAH. Transplantacija hepatocita bila je uspješna kod ljudi zbog drugih urođenih pogrešaka metabolizma jetre, poput poremećaja skladištenja glikogena i oštećenja ciklusa ureje. Pokušavaju se utvrditi najbolji načini koji bi omogućili da transplantirani hepatociti imaju prednost rasta odnosu na native stanice (26).

3.8. Deficijencija fenilalanin hidroksilaze u trudnoći

Žene s nedostatkom PAH-a koje su tijekom djetinjstva i adolescencije bile odgovarajuće liječene, imaju normalan fizički i intelektualni i bihevioralni razvoj. Međutim, ako žena ima povišene koncentracije fenilalanina u plazmi tijekom trudnoće, postoji visoki rizik nastanka disrupcija i intelektualnog zaostajanja kod djeteta, budući da je fenilalanin teratogen (27). Preporučuje se prekonceptijsko genetičko savjetovanje, postizanje i održavanje koncentracije fenilalanina u majčinom serumu manjom od 360 $\mu\text{mol} / \text{L}$ tri mjeseca prije začeća. Provodi se procjena rizika od rane osteopenije te prekid liječenja dodatkom aminokiselina (1).

Tijekom trudnoće preporučuje se održavanje koncentracija fenilalanina u majčinom serumu

od 120-360 $\mu\text{mol} / \text{L}$. Kod neplaniranih trudnoća savjetuje se brza ponovna primjena kontrolirane dijete. Unatoč ograničenim podacima, dodatak sapropterina može biti prikladan uz dijetalnu terapiju. Preporučuje se praćenje prehrambenog unosa u trudnica sa nedostatkom PAH-a kako bi se osigurao unos s pravilnim udjelom proteina, masti i ugljikohidrata. Fetalne anomalije procijenjuju se ultrazvukom visoke rezolucije i fetalnim ehokardiogramom (1).

U postporođajnom razdoblju, dojenje se provodi, ukoliko dijete nema manjak fenilalanin-hidroksilaze (28).

4. Moderni pristup genetičkom testiranju

Prošireni reproduktivni genomski probir postupak je genetičkog testiranja pojedinaca i parova na autosomno-recesivne i X-vezane recesivne bolesti (29). Takav probir se može obaviti prije trudnoće ili u ranoj fazi trudnoće. Kada su oba partnera nosioci genskih mutacija za autosomno recesivne bolesti, vjerojatnost da će njihovo dijete oboljeti od te bolesti iznosi 25 %. Ovisno o njihovom izboru, parovi s povećanim rizikom imaju brojne reproduktivne mogućnosti kojima mogu izbjeći bolest djeteta ili se pripremiti za dijete s tom bolešću. To uključuje testiranje ploda začetog umjetnom oplodnjom ili genetičko testiranje tijekom trudnoće s mogućnošću završetka trudnoće ukoliko je nađen poremećaj u ploda. Prošireni genomski probir osobama s povećanim rizikom pruža mogućnost odluke o rođenju djeteta s genetskim poremećajem ili poduzimanje mjera koje će to spriječiti (29).

Programi probira statusa nositelja uvedeni su 1970-ih godina. U početku su se programi probira koristili samo među etničkim skupinama koje su imale visoku učestalost određenih autosomno-recesivnih bolesti (30). Na primjer, koristio se probir na Tay-Sachsovu bolest među Aškenazi židovskim zajednicama i probir na β -talasemije među mediteranskim stanovništvom. Godine 1989. probir na cističnu fibrozu postao je dostupan nakon identifikacije gena povezanog s tom bolešću. Krajem 1990-ih, donesen je dogovor da probir

na cističnu fibrozu treba ponuditi svim pojedincima ili parovima koji traže prenatalnu ili prekoncepcijsku skrb. Nakon toga, izdano je nekoliko preporuka kao podrška pan-etničkom probiru na cističnu fibrozu. Taj potez dijelom je bio motiviran poteškoćama kod određivanja pripadnosti pojedinaca jednoj etničkoj skupini (29). Tijekom proteklog desetljeća, mogućnost probira sve se češće nudila širim populacijama. U nekim dijelovima svijeta, pan-etnički probir uobičajen je za hemoglobinopatije i talasemije, a nedavno se preporučuje i kod pojave spinalne mišićne atrofije i fragilnog X-sindroma. Uz porast pan-etničkog probira te nove učinkovite genetičke tehnologije, poput sekvenciranja sljedeće generacije, uvjeti provođenja probira znatno su poboljšani. Razvojem tehnologije potrebne za genetičko testiranje, ono postaje jeftinije i dostupnije širim populacijama. Provođenje proširenog genomskog probira na bolesti pokazuje veću korist nego testiranje na mutacije jednog gena (31).

Nekoliko je potencijalnih prednosti proširenog genomskog probira. Prvo, uključivanje više uvjeta i većeg broja ljudi u programe probira, povećava priliku parovima da donose reproduktivne odluke (30). Drugo, provođenje proširenog probira moglo bi približiti značenje statusa nositelja općoj populaciji i tako smanjiti rizik od socijalne stigmatizacije (30). Na kraju, provođenje proširenog genomskog probira na bolesti kod nositelja može biti isplativije od ispitivanja jedne bolesti. Unatoč potencijalnim prednostima, postoje i potencijalne štetne posljedice, izazovi za implementaciju tih programa te pitanja koja se nameću kod provođenja proširenih probira, npr. kada ih provoditi, trebaju li se testirati pojedinci ili parovi, koja bi stanja trebala biti uključena u probir, kolika je informiranost javnosti, financijska isplativost te etička pitanja (30).

5. Rasprava

Deficijencija PAH-a je metabolički autosomno recesivni poremećaj čiji se simptomi, kao što su intelektualno zaostajanje, konvulzije, hiperaktivnost, mikrocefalija, mogu uspješno prevenirati pravovremenom dijagnozom (1). Klinička slika deficijencije PAH-a ovisi o koncentraciji fenilalanina u krvi pa se bolest može manifestirati u blagom ili teškom obliku te se ovisno o tome uvodi kontrolirana prehrana kao osnovna metoda liječenja (19). Ističe se korist novorođenačkog probira kojim se postavlja sumnja na deficijenciju PAH-a, što se potvrđuje genetičkim testiranjem (17). Rana dijagnostika vrlo je važna, međutim, još važnije je spriječiti samu pojavu bolesti. Iz tog razloga se razvojem medicine i genetičkog testiranja uvodi prošireni genomski probir.

Većina stručnjaka preporučuje proširenje probira statusa nositelja na sve žene i njihove partnere koji planiraju trudnoću, bez obzira na podrijetlo (32). Ovaj pan-etički pristup razlikuje se od univerzalnog ili populacijskog pristupa jer je usmjeren na subpopulacije pojedinaca i parova koji se nalaze u prenatalnom ili prekonceptijskom razdoblju, a ne svih pojedinaca. Postavlja se pitanje treba li prošireni probir statusa nositelja ponuditi samo parovima ili i pojedincima. Ponuda probira samo parovima donosi najveću kliničku korist jer je samo manji postotak parova nositelj istih autosomno recesivnih stanja. Ovaj pristup bi također osigurao da parovi zajedno donose odluke o proširenom testiranju. Međutim, pojedinačni probir omogućuje generacijsko promatranje članova obitelji i može umanjiti neizvjesnost kod pojedinca s poznatim obiteljskim rizikom, kao i omogućiti im informacije ukoliko promijene partnera (29, 31).

Sljedeće pitanje koje se postavlja je koje je optimalno vrijeme za provođenje probira. Većina stručnjaka smatra da je idealno vrijeme za provedbu probira statusa nositelja razdoblje prekonceptije jer omogućava više mogućnosti, npr. izbjegavanje trudnoće ili korištenje naprednih reproduktivnih tehnologija za začeće, za razliku od probira tijekom trudnoće. Iako

je prekonceptijska skrb općenito prepoznata kao vrlo važna, u Sjedinjenim Američkim Državama podaci odabranih država pokazuju da je samo 33% žena koje su nedavno rodile, prije trudnoće razgovaralo sa zdravstvenim djelatnikom o unaprijeđenju zdravlja (29,31). Također, uvidjelo se da se više probira na cističnu fibrozu provodi u prenatalnom nego u prekonceptijskom razdoblju, unatoč prihvaćenom mišljenju da je prekonceptijsko razdoblje idealno vrijeme za provedbu probira. To se stanje pripisuje nedostatku interesa pojedinaca za probir prije začeća. Ukoliko se prošireni probiri nositelja uvede u uobičajenu kliničku praksu, parovi bi drugačije pristupali planiranju trudnoće (29,31). Nadalje, trenutne smjernice ne određuju koja bi stanja trebala biti uključena u prošireni genomski probir, ali većina preporučuje neka specifična stanja kao što su cistična fibroza i spinalna mišićna atrofija. Također, preporučuje se testiranje na bolesti koje se javljaju u djetinjstvu te imaju veliki negativni utjecaj na kvalitetu djetetova života. Osim dobi javljanja i kliničke slike, većina smjernica uključuje i kriterije kao što su učestalost pojave bolesti, prodornost fenotipa i mogućnosti koje roditelji mogu poduzeti mjere kao odgovor na pozitivan nalaz. Definiranje kliničkog stanja kao teškog i ozbiljnog često se pokazuje izazovnim. Lazarin i suradnici razvili su sustavnu klasifikaciju težine bolesti tvrdeći da je ozbiljnost dobar kriterij jer parovi ne mijenjaju svoje planove kad stanje shvate kao blago, a zdravstveni sustav može odbiti sprječavanje rođenja oboljelog djeteta s blagim stanjem (29,31). Rezultati istraživanja provedenog među Aškenazi Židovima pokazuju da 37% ispitanika preferira prošireni panel koji sadrži zatvoreni popis bolesti, dok 43% misli da bi ljudi trebali moći sami odlučiti u kojim će se kategorijama poremećaja testirati (29,31). Problem koji se javlja kod provođenja proširenog genomskog probira je nepostojanje javnog interesa za time, što je povezano s manjkom osviještenosti i znanja. U usporedbi s visokorizičnim skupinama s opterećenom obiteljskom anamnezom, opća populacija je manje upoznata s genetskim stanjima i ima manje znanja ili iskustva. Ostaje nejasno je li nizak rizik opće populacije koji iznosi oko 1-2%, shvaćen kao značajan rizik za većinu ljudi (29,31). Sve veći broj studija ispituje razloge

motiviranosti među pojedincima koji su se odlučili na prošireno genetičko testiranje te je zaključeno da su informiranost i / ili priprema za mogućnost rađanja djeteta s genetičkim poremećajem ključni razlozi motivacije. Također, navodi se da su najčešći razlozi odbijanja probira nedostatak vremena, nezainteresiranost te da osobe ne žele znati informaciju ili nežele kod sebe izazvati anksioznost. Studije se provode među populacijom s visokim socioekonomskim statusom i pristupom visokokvalitetnoj medicinskoj skrbi pa ne opisuju javnost u potpunosti. Potrebna su dodatna istraživanja za shvaćanje kako će se među širom populacijom proširiti svijest o proširenom genetičkom probiru. Ističe se da je potrebno genetičko testiranje prije provedbe probira, kao i informirani pristanak (29,31).

Kod provođenja proširenog genomskog probira, javljaju se financijski problemi. Državni zavodi za zdravstveno osiguranje imaju ograničena sredstva i moraju birati između različitih opcija pri određivanju raspodjele tih sredstava. Smatra se da visoki prioritet ima liječenje bolesnika već oboljelih osoba, što bi moglo doprinijeti da se proširenim genomskim probirima dodijeli nizak prioritet (29,31). Preispituje se korist proširenog probira među širom populacijom, budući da reproduktivne odluke kao što su pobačaj ili metode umjetne oplodnje, donose parovi kod kojih su i muškarac i žena nositelji autosomno recesivne bolesti, a takvi parovi čine manji postotak populacije. Kod proširenog genetičkog probira, javljaju se i neka etička pitanja. Od početka provođenja proširenog probira, postoji zabrinutost da bi se prema osobama nosiocima mogli oblikovati negativno stavovi društva te se javiti stigmatizacija. Može se stvoriti mišljenje da su životi tih pojedinaca manje vrijedni od ostalih. Ova etička pitanja predstavljaju veliki izazov u provođenju proširenog probira (29,31).

6. Zaključci

Deficijencija PAH-a je autosomno recesivni metabolički poremećaj. Klinički se manifestira intelektualnim poremećajima, problemima u ponašanju, epileptičnim napadajima i varijabilnom mikrocefalijom. Ukoliko se bolest rano dijagnosticira, može se spriječiti manifestacija simptoma. Iz tog razloga, bitno je naglasiti značaj novorođenačkog probira. Bolest se potvrđuje metodama genetičkog testiranja, a osnovna terapija je kontrolirana prehrana. Važno je kontinuirano pridržavanje kontrolirane prehrane tijekom cijelog životnog vijeka. S razvojem metoda genetičkog testiranja, počinje se provoditi prošireni genomski probir statusa nositelja prije koncepcije ili tijekom rane trudnoće. To je važna karika u prevenciji i praćenju vjerojatnosti pojavljivanja deficijencije PAH-a. Teži se informiranju javnosti o proširenom probiru, što bi rezultiralo povećanjem osviještenosti javnosti o njegovom provođenju.

7. Sažetak

Deficijencija PAH-a je metabolička autosomno recesivna bolest uzorokovana varijantama sekvence gena za PAH ili deficijencijom kofaktora BH4 potrebnog za pretvorbu fenilalanina u tirozin. Karakterizirana je povećanim koncentracijama aminokiseline fenilalanina u krvi te fenilpiruvične kiseline u mokraći. U kliničkoj slici javlja se specifičan tjelesni miris, intelektualno zaostajanje, epileptični napadi, mikrocefalija. Simptomi variraju od blagih do teških. U ranom prepoznavanju deficijencije PAH-a, veliku važnost ima novorođenački probir. Ukoliko novorođenački probir ukaže na postojanje deficijencije PAH-a, provodi se dijagnostičko genetičko testiranje. Određivanje statusa nositelja kod srodnika provodi se nakon dijagnosticiranja bolesti u probanda. Ako su oba partnera nositelji, rizik za autosomno recesivnu bolest iznosi 25 %. Osnovni korak liječenja deficijencije PAH-a je kontrolirana prehrana, a mogu se primjeniti sapropterin i transporteri za velike neutralne aminokiseline. Također, istražuje se učinak fenilalanin-amonij-lijaze i transplantacije hepatocita. Kod žena koje imaju povišene koncentracije fenilalanina u plazmi tijekom trudnoće, postoji visoki rizik nastanka disrupcija i intelektualnog zaostajanja kod djeteta. Iz tog razloga se preporučuje prekonceptijsko genetičko savjetovanje te postizanje i održavanje koncentracije fenilalanina u majčinom serumu manjom od 360 $\mu\text{mol} / \text{L}$ tri mjeseca prije začeća. U posljednje vrijeme, provodi se prošireni genomski probir statusa nositelja čime se, uz informiranje javnosti i genetičko savjetovanje, može spriječiti pojava autosomno recesivnih bolesti. Cilj rada je opisati mogućnosti novorođenačkog probira i genetičkog testiranja u svrhu što ranije dijagnostike deficijencije PAH-a, ali i istaknuti važnost prepoznavanja kliničkih obilježja te modernog pristupa genetičkom testiranju kojim se otkrivaju nositelji autosomno recesivnih bolesti.

8. Summary

Deficiency of PAH is a metabolic autosomal recessive disease caused by a PAH gene sequence variants or a BH₄ cofactor deficiency required to convert phenylalanine to tyrosine. It is characterized by increased levels of the amino acid phenylalanine in the blood and phenylpyruvic acid in the urine. In the clinical presentation there is a specific body odor, intellectual retardation, seizures, microcephaly. Symptoms range from mild to severe. In the early recognition of PAH deficiency, neonatal screening is of great importance. If newborn screening indicates PAH deficiency, diagnostic genetic testing is performed. Determination of the status of the carrier in a relative is made after the diagnosis of the disease in the proband. If both partners are carriers, the risk of autosomal recessive disease is 25%. A basic step in the treatment of PAH deficiency is a controlled diet, and sapropterin and transporters for large neutral amino acids can be used. The effect of phenylalanine-ammonium lyase and hepatocyte transplantation is also being investigated. In women with elevated plasma phenylalanine concentrations during pregnancy, there is a high risk of dysfunction and intellectual disability in the newborn. For this reason, pre-conceptual genetic counseling and the attainment and maintenance of maternal serum phenylalanine concentrations less than 360 $\mu\text{mol} / \text{L}$ for three months prior to conception are recommended. Recently, an extended genomic screening of carrier status has been carried out, which, in addition to general public education and genetic counseling, can prevent the occurrence of autosomal recessive diseases. The aim of this study is to describe the possibilities of newborn screening and genetic testing for early diagnosis of PAH deficiency, but also to emphasize the importance of recognizing clinical features and a modern approach to genetic testing revealing carriers of autosomal recessive diseases.

9. Literatura

1. Regier DS, Greene CL. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. GeneReviews [Internet]. [ažurirano 18.12.2019.; citirano 19.12.2019.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1504/>
2. Blau N, Hennermann JB, Langenbeck U, Lichter-Konecki U. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol Genet Metab.* 2011; 104 Suppl: S2–9.
3. Christ SE. Asbjørn Følling and the discovery of phenylketonuria. *J Hist Neurosci.* 2003; 12(1): 44–54.
4. Hanulak B. Zdravstvena njega djeteta oboljelog od fenilketonurije i galaktozemije. Završni rad. [Internet]. [ažurirano 7.11.2016.; citirano 19.12.2019.]. Dostupno na: <https://repozitorij.unin.hr/islandora/object/unin%3A937/datastream/PDF/view>
5. Phenylketonuria. Orphanet [Internet]. [ažurirano 18.12.2019.; citirano 19.12.2019.]. Dostupno na: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=EN&Expert=716
6. Čagljević D. Usporedba koncentracija fenilalanina, tirozina i njihovih omjera (Phe/Tyr) izmjerenih na dvama tandemskim spektrometrima masa u svrhu novorođenačkog probira i praćenja metaboličke kontrole pacijenata s fenilketonurijom. Diplomski rad [Internet]. [ažurirano 16.6.2018.; citirano 19.12.2019.]. Dostupno na: <https://repozitorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:939/preview>
7. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat.* 2016; 37(6): 508-15.
8. Rajabi F, Rohr F, Wessel A, Martell L, Dobrowolski SF, Guldborg P, et al. Phenylalanine hydroxylase genotype-phenotype associations in the United States: A single center study. *Mol Genet Metab.* 2019; 128(4): 415-21.
9. Dyer CA. Pathophysiology of phenylketonuria. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 1999; 5(2): 104–12.
10. Jaulent P, Charriere S, Feillet F, Douillard C, Fouilhoux A, Thobois S. Neurological

manifestations in adults with phenylketonuria: new cases and review of the literature. *J Neurol.* 2020; 267(2): 531-42.

11. Brumm VL, Bilder D, Waisbren SE. Psychiatric symptoms and disorders in phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2010; 99 Suppl 1: S59-63.

12. Hawks Z, Hood AM, Lerman-Sinkoff DB, Shimony JS, Rutlin J, Lagoni D, et al. White and gray matter brain development in children and young adults with phenylketonuria. *NeuroImage Clin.* 2019; 23: 101916.

13. Burgard P. Development of intelligence in early treated phenylketonuria. *Eur J Pediatr Suppl.* 2000; 159 Suppl 2: S74-9.

14. Anastasoae V, Kurzius L, Forbes P, Waisbren S. Stability of blood phenylalanine levels and IQ in children with phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2008; 95(1–2): 17–20.

15. Lubout CMA, Blanco FA, Bartosiewicz K, Feillet F, Gizewska M, Hollak C, et al. Bone mineral density is within normal range in most adult PKU patients. *J Inherit Metab Dis.* 2019; 43(2): 251-8.

16. Walter JH. Vitamin B12 deficiency and phenylketonuria. *Mol Genet Metab.* 2011; 104 Suppl: S52–4.

17. Van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, et al. The complete European guidelines on phenylketonuria: Diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis.* 2017; 12(1): 162.

18. Pitt JJ. Newborn screening. *Clin Biochem Rev.* 2010; 31(2): 57–68.

19. Bilandžija I, Barić I, Škaričić A, Zekušić M, Križić I, Petković Ramadža D, et al. Program proširenog novorođenačkog probira u Republici Hrvatskoj – zahtjevi i izazovi pravilnog uzimanja suhe kapi krvi. *Paediatr Croat Suppl.* 2018; 62(1): 10–4.

20. Al Hafid N, Christodoulou J. Phenylketonuria: a review of current and future treatments.

Transl Pediatr. 2015; 4(4): 304–17.

21. Rocha JC, MacDonald A. Dietary intervention in the management of phenylketonuria: current perspectives. *Pediatr Heal Med Ther.* 2016; 7: 155–63.

22. Kuvan. European Medicines Agency [Internet]. [ažurirano 4.3.2019.; citirano 19.12.2019.]. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kuvan>

23. Van Spronsen FJ, De Groot MJ, Hoeksma M, Reijngoud DJ, Van Rijn M. Large neutral amino acids in the treatment of PKU: From theory to practice. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33(6): 671–76.

24. Burlina AP, Cazzorla C, Massa P, Polo G, Loro C, Gualdi D, et al. Large Neutral Amino Acid Therapy Increases Tyrosine Levels in Adult Patients with Phenylketonuria: A Long-Term Study. *Nutrients.* 2019; 11(10): 2541.

25. Sarkissian CN, Gámez A. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol Genet Metab.* 2005; 86 Suppl 1: 22–6.

26. Vogel KR, Kennedy AA, Whitehouse LA, Gibson KM. Therapeutic hepatocyte transplant for inherited metabolic disorders: Functional considerations, recent outcomes and future prospects. *J Inherit Metab Dis.* 2014; 37(2): 165–76.

27. Prick BW, Hop WCJ, Duvekot JJ. Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in pregnancy: Pregnancy complications and neonatal sequelae in untreated and treated pregnancies. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(2): 374–82.

28. Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev.* 2008; 29(1): 31–41.

29. Delatycki MB, Alkuraya F, Archibald A, Castellani C, Cornel M, Grody WW, et al. International perspectives on the implementation of reproductive carrier screening. *Prenat Diagn.* 2020; 40(3): 301-10.

30. Lazarin GA, Haque IS. Expanded carrier screening: A review of early implementation and

literature. *Semin Perinatol.* 2016; 40(1): 29–34.

31. Kraft SA, Duenas D, Wilfond BS, Goddard KAB. The evolving landscape of expanded carrier screening: challenges and opportunities. *Genet Med.* 2019; 21(4): 790–97.

32. Lazarin GA, Detweiler S, Nazareth SB, Ashkinadze E. Genetic Counselors' Perspectives and Practices Regarding Expanded Carrier Screening after Initial Clinical Availability. *J Genet Couns.* 2016; 25(2): 395–404.

10. Životopis

Ema Dejhalla rođena je 15. studenoga 1995. godine u Rijeci, u Republici Hrvatskoj. Nakon završene Osnovne škole Vladimir Gortan, uz koju je završila i osnovnu glazbenu školu Ivana Matetića Ronjgova, upisuje prirodoslovno-matematički smjer u Prvoj Sušačkoj Hrvatskoj Gimnaziji u Rijeci. Po završetku gimnazijskog obrazovanja i polaganja ispita državne mature, 2014. godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, smjer Medicina čiji je redoviti student bila svih 6 godina (od 2014. do 2020. godine). Tijekom studija, aktivni je sudionik kongresa Riječki dani primarne zdravstvene zaštite, MedRi Znanstveni piknik te Kongres prehrane i kliničke dijetetoterapije. Volonterski je sudjelovala u fakultetskim aktivnostima Kapi života i Teddy Bear Hospital. Od stranih jezika tečno govori engleski i talijanski jezik, a posjeduje i osnovno znanje francuskog jezika.