

X-VIAZANÁ ADRENOLEUKODYSTROFIA – NAJČASTEJŠIA DEDIČNÁ METABOLICKÁ PORUCHA PEROXIZÓMOV

doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.¹, RNDr. Robert Petrovič¹, Mgr. Ján Futas¹, MUDr. Darina Ďurovčíková, CSc.¹, MUDr. Juraj Štofko², PhD., MUDr. Stanislav Jančo, CSc.², MUDr. Mária Brezinová², prof. MUDr. Peter Turčáni, PhD.²

¹Centrum lekárskej genetiky FNŠP Bratislava

²I. neurologická klinika FNŠP a LF UK Bratislava

X-viazaná adrenoleukodystrofia (X-ALD) je najčastejšie dedičné peroxizómové ochorenie vyznačujúce sa dedičnosťou viazanou na chromozóm X. Toto ochorenie s veľkou fenotypovou variabilitou sa plne manifestuje u mužov, ale miernejšie formy postihnutia sa vyskytujú aj u žien. Hlavným patobiochemickým znakom tohto ochorenia je akumulácia karboxylových (mastných) kyselín s veľmi dlhým reťazcom – VLCFA v tkanivách centrálneho nervového systému, periférnych nervov, nadobličiek a v telových tekutinách. Gén ABCD1 zodpovedný za X-ALD je zložený z 10 exónov a kóduje peroxizómový membránový proteín pozostávajúci zo 745 aminokyselín. Diagnostiku X-ALD pomocou zobrazovacích techník (MR, CT), neurofyziológických vyšetrení, je potrebné doplniť o biochemické vyšetrenie (zvýšenie VLCFA v plazme) a molekulárno-genetické analýzy (identifikácia mutácie v ABCD1 géne), ktoré sú v SR dostupné v Centre lekárskej genetiky FNŠP Bratislava. **Kľúčové slová:** adrenoleukodystrofia, adrenomyeloneuropatia, VLCFA, peroxizómy.

Neurol. pro praxi, 2006; 2: 84–89

1. Funkcia peroxizómov v metabolizme vyšších karboxylových kyselín

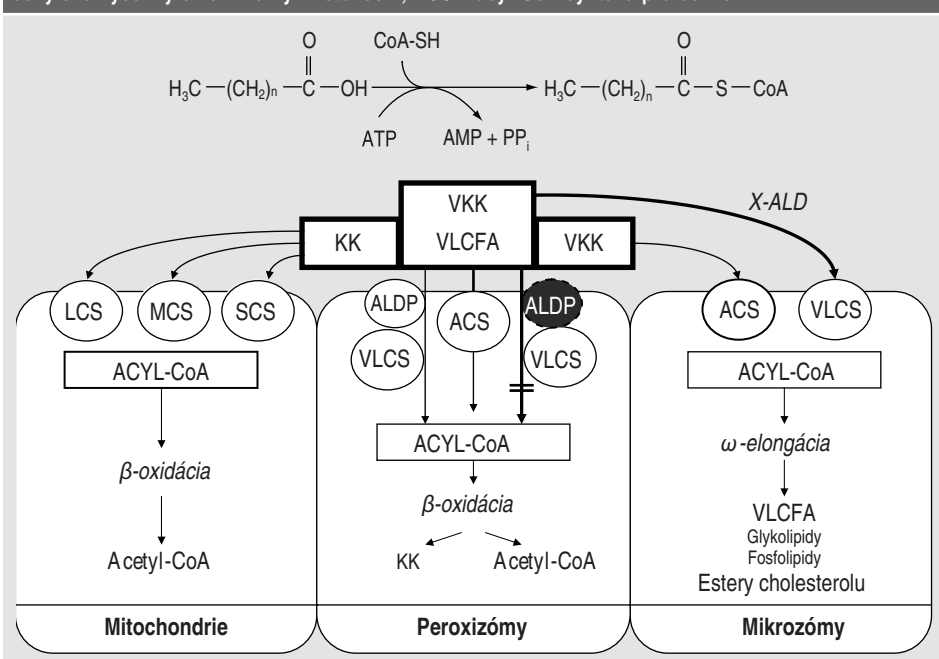
Na metabolizme vyšších karboxylových kyselín (VKK) sa v bunkách zúčastňujú mitochondrie, peroxizómy, endoplazmatické retikulum a cytoplazma. Zatiaľ čo úloha mitochondrií a peroxizómov v metabolizme VKK je spojená s ich degradáciou, cytoplazma a endoplazmatické retikulum dominujú v syntetických pochodoch lipidov. Pri degradácii uhlíkového skeletu karboxylových kyselín, hlavne pomocou β -oxidačnej špirály, existujúce rozdiely medzi enzýmovými konštituentmi mitochondrií a peroxizómov podmieňujú rôznu efektívnosť degradácie VKK vo vzťahu k dĺžke reťazca. Enzýmové systémy β -oxidácie karboxylových kyselín mitochondrií sa evolučne diferencovali a zabezpečujú u eukaryotických buniek selektívnu oxidáciu karboxylových kyselín pre krátke, stredne dlhé a dlhé reťazce. Pre uvedenú špecializáciu je podstatnou existenciou viacerých typov mitochondriálnych acyl-CoA dehydrogenáz – SCAD (short chain acyl-CoA dehydrogenase), MCAD (medium chain acyl-CoA dehydrogenase), LCAD (long chain acyl-CoA dehydrogenase), pričom je možná čiastočná substitúcia ich metabolických funkcií. Mutácie génov pre jednotlivé dehydrogenázy zväčša vedú k enzýmovej deficiencii a podmieňujú závažné metabolické ochorenia mitochondriálneho kompartmentu (16). Na rozdiel od mitochondriálnej β -oxidácie karboxylových kyselín, ktorá je nedostatočná pre oxidáciu karboxylových kyselín s veľmi dlhým reťazcom (very long chain fatty acids – VLCFA), peroxizómový systém efektívne katalyzuje oxi-

dáciu karboxylových kyselín aj s dĺžkou reťazca väčšou ako 22 uhlíkov. Enzýmový systém oxidácie karboxylových kyselín v peroxizónoch živočíšnych buniek popísali ako prví Lazarow a deDuve (8) a vyznačoval sa v porovnaní s mitochondriálnymi systémami viacerými rozdielmi. Vstup mnohých molekúl do peroxizómov nevyžaduje transportné bielkoviny

pravdepodobne z dôvodu existencie pórov v membráne (19). VKK môžu vstúpiť do peroxizómov cez tieto póry, hoci prítomnosť viacerých typov karnitín-acyl-CoA transferáz v membráne umožňuje taktiež využitie translokačného mechanizmu vstupu acyl-karnitínov do peroxizómov (18). Aj u peroxizómov možno uvažovať o tom, že vstup nízkomolekulových

Obrázok 1. Aktivácia karboxylových kyselín a karboxylových kyselín s veľmi dlhým reťazcom, ich transport a metabolizmus v subcelulárnych štruktúrach:

KK – karboxylové kyseliny; VKK – vyššie karboxylové kyseliny; VLCFA – karboxylové kyseliny s veľmi dlhým reťazcom; LCS, MCS, SCS – mitochondriálne acyl-CoA syntázy pre karboxylové kyseliny s dlhými, stredne dlhými a krátkymi reťazcami; ALDP – adrenoleukodystrofický proteín; VLCS – syntáza pre karboxylové kyseliny s veľmi dlhým reťazcom; ACS – acyl-CoA syntáza pre bežné VKK



látok a štruktúrnych molekúl je sprostredkovaný ATP viazucimi transportérmi.

Výnimočnou biochemickou črtou peroxizómov je existencia acyl-CoA syntázy špecifickej pre dlho-reťazcové karboxylové kyseliny v membráne peroxizómov. Tento enzým (very long chain acyl-CoA synthetase – VLCS, acyl-CoA synthetase long chain family member 1 – ACSL1) zabezpečuje aktiváciu širokej škály VKK vrátane karboxylových kyselín s veľmi dlhým reťazcom. Enzým je okrem peroxizómov prítomný aj v endoplazmatickom retikule, kde zohráva úlohu pri biosyntéze lipidov, nenachádza sa však v mitochondriách. Gén pre VLCS je lokalizovaný na chromozóme 15, lokus 15q21,2. Enzým patrí k rodine VLCS/FATP (fatty acid transporter proteins), do ktorej patrí prinajmenšom 6 ľudských proteínov obsahujúcich vždy dve evolučne konzervované domény. Napriek rozhodujúcej úlohe v etiopatogenéze X-ALD nie je úloha transmembránového proteínu – ALDP (adrenoleukodystrophy protein) v procesoch zabezpečujúcich aktiváciu VLCFA dostatočne objasnená. Funkčnosť tohoto proteínu je však pre nasledujúce procesy β -oxidácie a degradácie karboxylových kyselín bezpodmienečne nevyhnutná (obrázok 1).

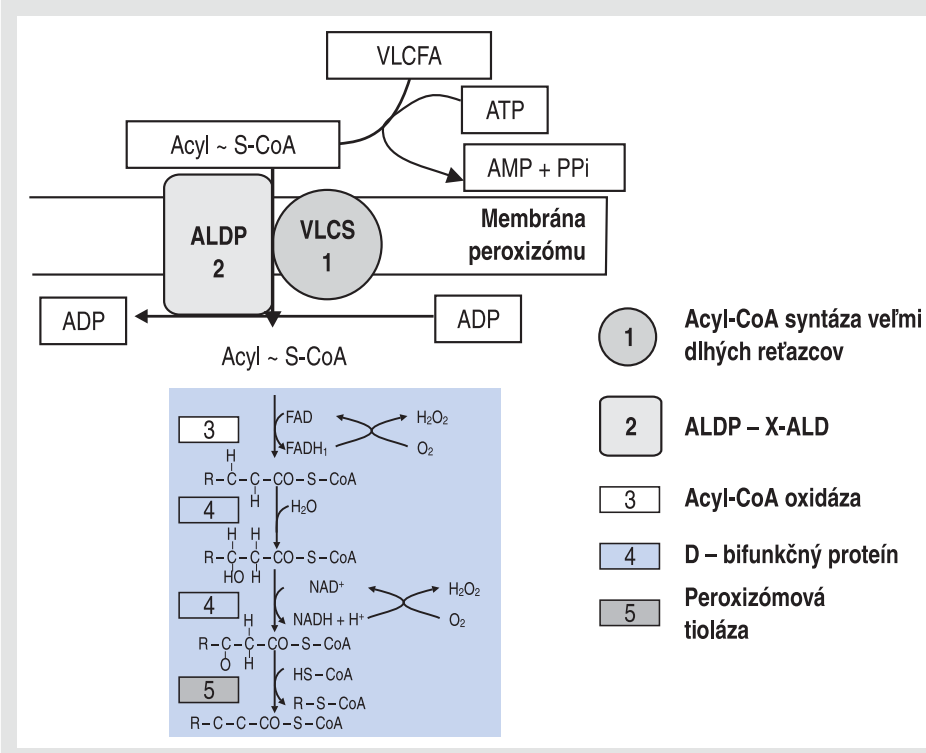
Peroxisómová β -oxidácia zahŕňa štyri po sebe idúce reakcie, ktoré s výnimkou prvej (enzým nie je dehydrogenáza ale oxidáza) sú analogické ako u mitochondrií aj keď sú katalyzované odlišnými proteínmi. Ľudské peroxizómy obsahujú dve rôzne acyl-CoA oxidázy. Prvý enzým zabezpečuje oxidáciu mo-

nokarboxylových kyselín so stredne dlhým až veľmi dlhým reťazcom, vrátane kyseliny lignocerovej (C24:0) a cerotovej (C26:0). Druhý enzým katalyzuje oxidáciu CoA esterov 2-metyl-karboxylových kyselín ako sú napríklad pristanoyl-CoA (metabolit fytnovej kyseliny) a žľových kyselín (di- a trihydroxycholestanoyl-CoA). Druhá a tretia reakcia peroxizómovej β -oxidácie je katalyzovaná enzýmom, ktorý vlastní aktivity tak 2-enoyl-CoA hydratázy ako aj aktivity NAD⁺- β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy. Enzým dostal pomenovanie ako D-bifunkčný proteín (DBP), hoci správnejší by bol názov trifunkčný proteín, nakoľko enzým má aj aktivitu izomerázy. Ľudské peroxizómy obsahujú dva enzýmy katalyzujúce poslednú reakciu β -oxidácie. Tioláza-2 (pTH2-SCPx) hrá nezastupiteľnú úlohu v metabolizme 2-metyl-karboxylových kyselín (2-metyl branched chain fatty acids). Pri metabolizme karboxylových kyselín s nerozvetveným reťazcom participuje tak tioláza-2 ako aj tioláza-1 (pTH1). Podrobné údaje týkajúce sa úlohy peroxizómov v metabolizme sú publikované v prácach Wandersa (20) a Chandogu (6). Podstatné stránky metabolizmu karboxylových kyselín v peroxizómoch sú dokumentované na obrázku 2.

2. Etiopatogenéza X-ALD – molekulárno-genetická a biochemická podstata

X-ALD je najčastejšie dedičné peroxizómové ochorenie a vyznačuje sa dedičnosťou viazanou

Obrázok 2. Aktivácia a transport vyšších karboxylových kyselín v membráne peroxizómov a ich oxidácia v peroxizómovej matrix: VLCFA – karboxylové kyseliny s veľmi dlhým reťazcom; ALDP-adrenoleukodystrofický proteín; VLCS-syntáza pre karboxylové kyseliny s veľmi dlhým reťazcom



na chromozóm X. Ochorenie sa manifestuje u mužov a jeho incidencia je 1 : 21 000 (USA) až 1 : 15 000 (Francúzsko) mužov. I napriek X-recesívnemu charakteru dedičnosti sa miernejšie formy ochorenia vyskytujú aj u žien. Hlavným patobiochemickým znakom tohto ochorenia je akumulácia karboxylových (mastných) kyselín s veľmi dlhým reťazcom -VLCFA v tkanivách centrálného nervového systému, periférnych nervov, nadobličiek a v telových tekutinách. X-ALD gén (ABCD1) bol identifikovaný v roku 1993 Moserom a spol. (15) za použitia techniky pozičného klonovania. Gén lokalizovaný na chromozóme X sa nachádza v oblasti Xq28 v blízkosti génu pre glukóza-6-P dehydrogenázu a génového komplexu pre vizuálne pigmenty. ABCD1 gén zaberá približne 21 kb genómovej DNA, skladá sa z 10 exónov, ktoré sú transkribované vo forme 4,3 kb mRNA. Gén kóduje peroxizómový membránový proteín – ALDP obsahujúci 745 aminokyselín. Pre proteín je charakteristická prítomnosť šiestich transmembránových úsekov (domén) a hydrofilných domén, ktoré viažu ATP (nucleotide binding fold – NBF). ALDP patrí k tzv. ABC (ATP binding cassette) proteínom, ktoré vo forme dimérov plnia úlohu transportných bielkovín využívajúc energiu ATP (1). Popri ALDP ďalšie tri peroxizómové transportéry (half-transporters) boli identifikované a vyznačujú sa blízkou nukleotidovou a proteínovou sekvenciou a podobnou funkciou: ALDRP (adrenoleukodystrophy related protein), PMP70, P70R/PMP69 (peroxisome membrane protein). Tieto štyri transportéry môžu vytvárať rôzne heterodimérové kombinácie v membránach peroxizómov a zabezpečovať transport rôznych metabolitov. Zistilo sa, že ALDP ako homodimér alebo heterodimér zabezpečuje transport VLCFA cez peroxizómovú membránu buď ako voľných kyselín alebo ako CoA esterov (5). Homologické proteíny ALDR a PMP70 môžu takmer úplne obnoviť deficitnú peroxizómovú β -oxidáciu VLCFA v kultivovaných buniekových líniiach X-ALD pacientov (10). Existujú však aj údaje, ktoré predpokladajú, že ALDP zohráva úlohu v transporte enzýmu VLCS do peroxizómov. Pri nadexpresii VLCS a ALDP dochádza k synergickému efektu v oxidácii VLCFA u kultivovaných buniek, čo slúži ako nepriamy dôkaz, že medzi týmito dvoma enzýmami existuje funkčná kooperácia. Pre zabezpečenie funkcie VLCS je pravdepodobne nevyhnutná asociácia tohto enzýmu s ALDP.

Detailné informácie týkajúce sa počtu a charakteru zistených mutácií sú uvedené v databáze www.x-ald.nl. Doteraz databáza zahŕňa 866 zaregistrovaných prípadov mutácií spôsobujúcich X-ALD (rodín a jednotlivcov), z čoho 435 mutácií je jedinečných. Vo vzťahu ku všetkým uvedeným mutáciám (866) 61 % predstavujú mutácie meniace zmysel (zámena nukleotidu spôsobujúca výmenu aminokyseliny),

10 % nezmyselné mutácie (zámena nukleotidu vedie k vzniku stop kodónu), posunové mutácie 23 % (delecie a inzercie, ktoré nie sú násobkom troch nukleotidov, čím vedú k zmene čítacieho rámca), 4 % inzercie a delecie troch nukleotidov resp. ich násobku spôsobujúce prírastok alebo úbytok aminokyselín v ALDP, 3 % delecie jedného alebo viacerých exónov v dôsledku zmeny v zostihu mRNA. Až 75 % mutácií vedie k tomu, že proteín nie je vôbec v bunkách detegovaný dostupnými metódami. Na jednej strane žiadne významné rozdiely sa nepozorujú vo frekvencii mutácií vo vzťahu k jednotlivým exómom, na druhej strane predsa vyššie zastúpenie mutácií vykazujú úseky génu kódujúce transmembránové domény a ATP viažucu doménu. V SR je evidovaných 5 rodín, u ktorých aspoň u jedného člena rodiny došlo k manifestácii ochorenia. U všetkých vyšetrených pacientov patologický biochemický nález a určená diagnóza X-ALD bola potvrdená nálezom mutácie v ABCD1 géne sekvenčnou analýzou. Všetkých 5 rodín malo odlišné mutácie, ktoré neboli v literatúre zaznamenané.

V dôsledku deficitnej funkcie ALDP spôsobenej mutáciou génu sa výrazne znižuje kapacita syntézy CoA esterov VLCFA a ich následná β -oxidácia v peroxizómoch (14). Rezultujúce hromadenie VLCFA (karboxylových kyselín s väčším počtom uhlíkov ako 22) vedie k ďalším závažným patobiochemickým dôsledkom a morfológickým zmenám. V biologickom materiáli VLCFA nepredstavujú viac ako 0,1 až 10 % z celkového množstva VKK. Najbohatšie sú zastúpené v cerebrozidoch mozgu a v sfingomyelínoch erytrocytárnych membrán, kde podiel kyseliny cerotovej (C26:0) môže byť 1 až 5 %. V ostatných tkanivách sú VLCFA veľmi málo zastúpené. V plazme sú koncentrácie kyseliny cerotovej približne 100-krát nižšie ako iných bežných kyselín a nepredstavujú viac ako 0,01 % z celkového množstva VKK. Podstatným nálezom pri X-ALD je hromadenie kyseliny lignocerovej a cerotovej ako aj VKK s vyšším počtom uhlíkov (až 32) v organizme. Významným patobiochemickým nálezom je vzrast VLCFA vo frakciách cholesterol-esterov mozgu a kôry nadobličiek. Za fyziologických podmienok táto frakcia neobsahuje viac ako 5 % VLCFA, pri X-ALD však ich podiel stúpa na 20 až 60 %. Z fosfolipidovej frakcie najvýraznejší je vzostup VLCFA vo frakcii fosfatidylcholínov (lecitín). U glykolipidov a triacylglycerolov bol pozorovaný mierny nárast VLCFA. Hromadenie cholesterol-esterov s vysokým obsahom VLCFA v demyelinizovaných ložiskách sa však považuje skôr za dôsledok ako príčinu demyelinizácie, nakoľko v intaktných oblastiach mozgu u pacientov s X-ALD uvedený nález nebol pozorovaný. Pravdepodobným spúšťačom zápalového procesu a demyelinizácie je zmenená štruktúra gangliozidov, ktoré pri vysokom zastúpení VLCFA strácajú imuno-

supresívnu funkciu. Fosfatidylcholíny plazmatických membrán s vysokým obsahom VLCFA v komplexoch s bielkovinami pravdepodobne taktiež zodpovedajú za naštartovanie inflamačných procesov a demyelinizácie (14). Z diagnostického hľadiska dôležitý je nález 2 až 10-násobného zvýšenia kyseliny cerotovej v plazme a mierny vzrast hodnôt kyseliny lignocerovej. Doposiaľ nie je dostatočne zodpovedaná otázka, či k vzostupu VLCFA viac prispieva ich endogénna syntéza alebo diéta. Denný prísun VLCFA je približne 10 mg pričom ani výrazná diétna reštrikcia nevedie k zníženiu hladín VLCFA. Elongačný systém, ktorý je prítomný v endoplazmatickom retikule je schopný syntetizovať VLCFA z karboxylových kyselín s nižším počtom uhlíkov. Elongácia je omnoho efektívnejšia ak je prekursorom syntézy C20:0 ako C22:0. Regulačné mechanizmy kontrolujúce tento systém nie sú dostatočne preskúmané. Nenasýtená kyselina eruková (C20:1) pravdepodobne mechanizmom kompetitívnej inhibície spôsobí, že sa zníži syntéza VLCFA, čo sa prakticky využíva v terapii X-ALD. Je možné, že deficitná peroxizómová oxidácia spôsobí zvýšenie hotovosti prekursorov vhodných pre syntézu VLCFA procesmi elongácie. Tieto v endoplazmatickom retikule vstupujú vo zvýšenej miere do syntézy fosfolipidov, glykolipidov a esterov cholesterolu (obrázok 1). Vysoký obsah VLCFA zvyšuje insolubilitu membrán a znižuje podstatne väzbovú afinitu albumínu k fosfolipidom. Tieto štrukturálne zmeny i napriek zvýšenej nestabilite membrán zapríčinia spomalenie procesov obnovy fosfolipidových dvojvrstiev. Nepriaznivým funkčným dôsledkom membránových zmien v bunkách kôry nadobličiek je potlačenie odpovede receptorov na stimuláciu ACTH. Adrenálna insuficiencia u pacientov s X-ALD je často sprevádzaná zvýšenou hladinou plazmatického ACTH. Patogenéza distálnej axonopatie pri fenotypovom prejave adrenomyelopatie je nedostatočne objasnená, možno však predpokladať existenciu analogických biochemických zmien ako pri cerebrálnej forme.

3. Klinická manifestácia a formy X-ALD

Pojem adrenoleukodystrofia sa začal používať v 70-tych rokoch a vychádzal z charakteristického histologického a biochemického nálezu v tkanive kôry nadobličiek. Tkanivo obsahovalo početné tukové inklúzie zložené z esterov cholesterolu s vysokým zastúpením VLCFA. Biochemický dôkaz zvýšených hodnôt VLCFA v plazme, fibroblastoch, amniocytoch pomocou rutinných analytických metód plynovej chromatografie, prípadne spriahnutej s hmotovou spektrometriou umožnil postnatálnu i prenatalnú diagnostiku X-ALD, zvýšil záchytnosť ochorenia a urýchlil aj výskum jeho genetickej a bi-

ochemickej podstaty (11). Dnes je evidentné, že ochorenie má viacero fenotypových prejavov, pričom neexistuje kauzálny vzťah medzi typom mutácie a fenotypom. Dokonca i pri totožnej mutácii a v jednej rodine sa môžu vyskytovať rôzne fenotypy ochorenia. Moser (14) rozdeľuje X-ALD do fenotypov na základe veku nástupu ochorenia, miesta najťažšieho klinického postihnutia a progresie neurologických symptómov. Uvádza 7 fenotypov u mužov a 5 fenotypov u žien.

Detická cerebrálna forma sa manifestuje medzi 3 až 10 rokom a predstavuje 30 až 40 % prípadov ALD. Psychomotorický vývoj do nástupu ochorenia môže byť bez zjavných problémov. Pri manifestácii ochorenia dochádza k progresívnemu deficitu behaviorálnych, kognitívnych a neurologických funkcií. Emocionálna labilita, ťažkosti s porozumením reči, výpadok zorného poľa, zníženie zrakové ostrosti, apraxia, zlá orientácia v priestore môžu byť často prvé príznaky. Pri manifestácii v školskom veku dochádza k zhoršovaniu prospechu, zmenám správania, k zhoršovaniu pamäti, zmenám grafického prejavu. Známky demencie a epileptické kŕče sa môžu dostaviť v pokročilom štádiu ochorenia. Až u 90 % pacientov sa vyvinú známky adrenálnej insuficiencie. Neurodegeneratívne zmeny spôsobia exitus v priebehu niekoľkých rokov. Adolescentná cerebrálna ALD postihuje približne 5 % pacientov, manifestuje sa v neskoršom veku (11 až 21 rokov) s analogickými symptómami ako detská forma avšak progresia ochorenia je miernejšia.

Adrenomyeloneuropatia (AMN) je z hľadiska výskytu, ktorý predstavuje 40 až 45 % prípadov ochorenia najčastejšou formou. Obvyklý nástup ochorenia je medzi 30. až 40. rokom veku. U tohto fenotypu dominujú príznaky postihnutia miechy, periférnych nervov a nadobličiek. Časté prvé príznaky sú stuhnutie a slabosť nôh a sfinkterové poruchy. Postupne sa vyvíja spastická paraparéza, neuropatia a insuficiencia kôry nadobličiek. Spočiatku ochorenie môže byť považované za sclerosis multiplex alebo familiárnu spastickú paraparézu. U polovice pacientov s AMN sa môžu po dlhšom čase dostať príznaky cerebrálneho poškodenia často s rýchlym zhoršovaním klinického stavu. Celková slabosť, strata hmotnosti, ataky nauzey a zvracania sa môžu objaviť a sprevádzať neurologické príznaky a svedčia pre Addisonovu chorobu. Príznaky adrenálnej insuficiencie môžu až u 40 % pacientov predchádzať neurologickým symptómom. Častým znakom je aj hyperpigmentácia kože v dôsledku zvýšenia ACTH a MSH. Zo senzorických funkcií sú viac postihnuté sluchové ako zrakové funkcie. Bežne sa vyskytuje u pacientov s AMN impotencia a gonadálna insuficiencia. Problémy s močením sa vyskytujú u jednej tretiny pacientov.

Adultná cerebrálna forma sa vyskytuje približne u 5% pacientov s X-ALD a príznaky ochorenia sa manifestujú zväčša po 20. roku. Klinické symptómy sú analogické ako u detskej formy, často však prvé prejavy môžu byť behaviorálneho charakteru. Psychiatrická manifestácia s demenciou a symptómami podobnými schizofrénii môže predstavovať iniciálnu fázu ochorenia. Manické príznaky zahŕňujú psychickú dezinhibíciu, impulzivnosť, hypersexualitu, nadmierne utrácanie peňazí, hlučnosť. Až u polovice pacientov nemusia byť prítomné známky Addisonovej choroby.

Addisonova forma charakterizuje fenotyp, ktorý sa prejavuje iba adrenálnou insuficienciou a minimálnymi neurologickými príznakmi. Odhaduje sa, že postihuje približne 10% pacientov s ALD. Závažné je zistenie, že 20 až 50% pacientov s diagnózou primárnej adrenokortikálnej insuficiencie, ktorí boli podrobení v diferenciálnej diagnostike vyšetrovaniu VLCFA a molekulárne genetickej analýze, boli pacienti s X-ALD.

Olivo-ponto-cerebelárna forma sa vyznačuje postihnutím mozočka a mozgového kmeňa s manifestáciou u adolescentov alebo v dospelosti. Podobne ako „asymptomatická“ forma je zriedkavá. U asymptomatických pacientov s pozitívnym biochemickým a genetickým nálezom podrobné vyššetrenia predsa odhalia známky adrenálnej hypofunkcie alebo AMN.

Klinické prejavy u žien prenášajúcich X-ALD sa objavujú v neskoršom veku a neurologické abnormality sa zisťujú u menej ako 50% žien. U približne 20% heterozygotiek sa vyskytujú klinické prejavy pripomínajúce AMN. Prejavy postihnutia CNS a kôry nadobličiek sú zriedkavé a nepredstavujú viac ako 1 až 2%.

Počas 10 rokov pomocou biochemickej diagnostiky (VLCFA) bolo v SR zachytených 5 rodín s X-ALD, s odlišnými mutáciami a taktiež s rozdielnymi fenotypmi u pacientov s manifestáciou ochorenia. V jednej z rodín sú postihnutí dvaja súrodenci formou, ktorá sa v detskom veku prejavovala ako Addisonova choroba. V adolescentnom veku sa u oboch súrodencov diagnostikoval fibrotizujúci proces pľúc a približne od 24. roku života sa objavujú príznaky charakteristické pre AMN. Mladší brat zomrel vo veku 8 rokov na leukodystrofiu mozgu avšak biochemická diagnostika nebola u pacienta robená. X-ALD u ďalšieho pacienta bola diagnostikovaná vo veku 5 rokov a 10 rokov je na kontinuálnej terapii Lorenzovým olejom. Neurologická symptomatológia svedčí pre pomalú progresiu ochorenia. MRI abnormality sú mierneho stupňa a biochemický nález sa vyznačuje hraničnými hodnotami VLCFA. Pacient s cerebrálnou detskou formou X-ALD bol diagnostikovaný vo veku 7 rokov. Ochorenie sa vyznačuje typickými klinickými prejavmi a priebehom, ktorý je charakteristický pre túto formu. U ďalších dvoch pa-

cientov je problematické určenie fenotypu. U prvého z nich sa ochorenie manifestovalo až vo veku 35 rokov a prejavilo sa dezorientáciou, nesprávnym používaním slov, narážaním do okolitých predmetov a poruchami jemnej motoriky. V objektívnom náleze boli zistené fatické a amnestické poruchy, progresívna demencia a obojstranné poškodenie pyramídových dráh. Ochorenie veľmi rýchlo progredovalo a viedlo k exitu vo veku 38 rokov. Fenotypovo by bolo možné túto formu zaradiť do adultnej cerebrálnej formy. U druhého pacienta symptómy sa objavili vo veku 25 rokov a spolu s objektívnym nálezom svedčia pre postihnutie mozgu, mozgového kmeňa, mozočku ako aj miechy, takže zaradenie do jedného z definovaných fenotypov by bolo problematické.

4. Diagnostika X-ALD pomocou zobrazovacích techník, neurofyziologických a neuropsychologických vyšetrení

Zobrazovacie metódy sú veľmi dôležité v prípade diagnostiky X-ALD a pomáhajú aj v stratégii terapie, napr. pri výbere kandidátov na transplantáciu kostnej drene a pri hodnotení výsledkov liečby. Zmeny sú detekovateľné počítačovou tomografiou (CT), ale najužitočnejšia je magnetická rezonancia (MR), ktorá odhalí abnormality, ktoré často predchádzajú neurologickú klinickú symptomatiku. Zmeny v bielej hmote u detskej formy sa zistia až v 80% prípadov. Typické sú symetrické lézie v periventriculárnej bielej hmote v parietálnych a okcipitálnych lalokoch (9). Natívne CT mozgu ukáže bilaterálne hypodenzitné lézie v uvedených oblastiach. V MR obraze pri T2 vážení sú lézie hyperintenzitné. Podaním kontrastnej látky gadolína sa táto akumuluje pred hypodenzitnými léziami v T1 vážení, čo koreluje s histopatologickými zónami demyelinizácie s parciálnou stratou myelínu.

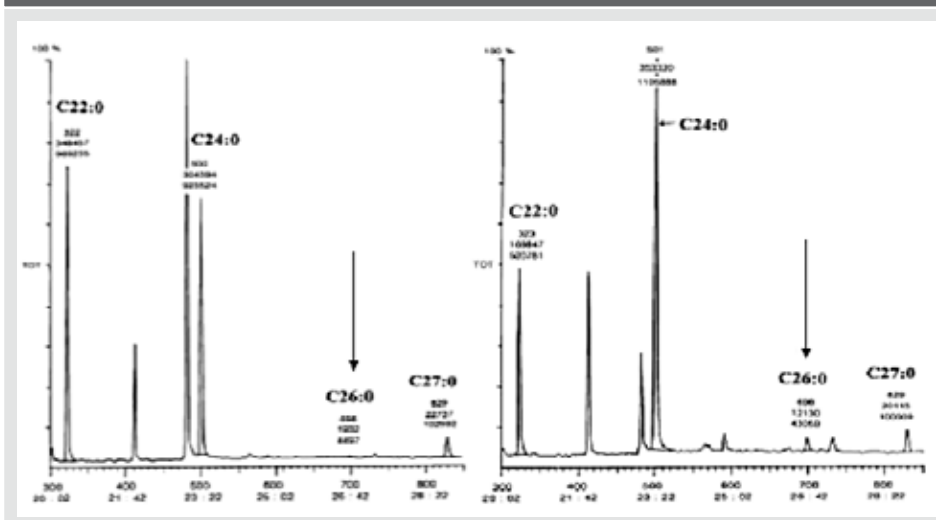
U AMN sú nálezy MR mozgu podobné ako u detskej formy asi v štvrtine prípadov. Nie vo všetkých prípadoch sú zmeny signálu v typickej lokalizácii parietálnych a okcipitálnych lalokov, u AMN môžu byť zmeny aj v iných oblastiach mozgu – v capsula interna, corona radiata, corpus callosum, cerebelárnych pedunkuloch, iniciálne lézie môžu byť aj v ponte a cerebele. Často sa pozorujú aj zmeny signálu a atrofia miechy, čo sa vysvetľuje centripetálnou extenziou distálnej axonopatie.

Vyšetrovaním sluchových evokovaných potenciálov (ABEP) sa zisťujú zmeny u takmer všetkých pacientov s AMN a u polovice heterozygotov. Najčastejšou abnormalitou sú predĺženie vlny I až III, čo odráža poruchy pontobulbárnych dráh. Zrakové evokované potenciály (VEP) bývajú zmenené menej často ako BAEP, u detí sú predĺžené latencie v asi 80% prípadov a u AMN len u necelých pätiny pacientov. Zmeny sa zistili aj pri elektromyografickom vyšetrení periférnych v, známky polyneuropatie možno preukázať u 80% mužov a 2/3 žien s AMN. Zmeny bývajú zmesou axonálneho a multifokálneho demyelinizačného poškodenia. Známky polyneuropatie možno zistiť aj u heterozygotov. Pravidelne bývajú prítomné abnormality somatosenzorických evokovaných potenciálov (SSEP) z dolných končatín. V elektroencefalograme (EEG) sa u pacientov s AMN často vyskytuje najmä v zadných zvodoch pomalá aktivita s vysokými vlnami.

5. Biochemická a molekulárno-genetická diagnostika X-ALD

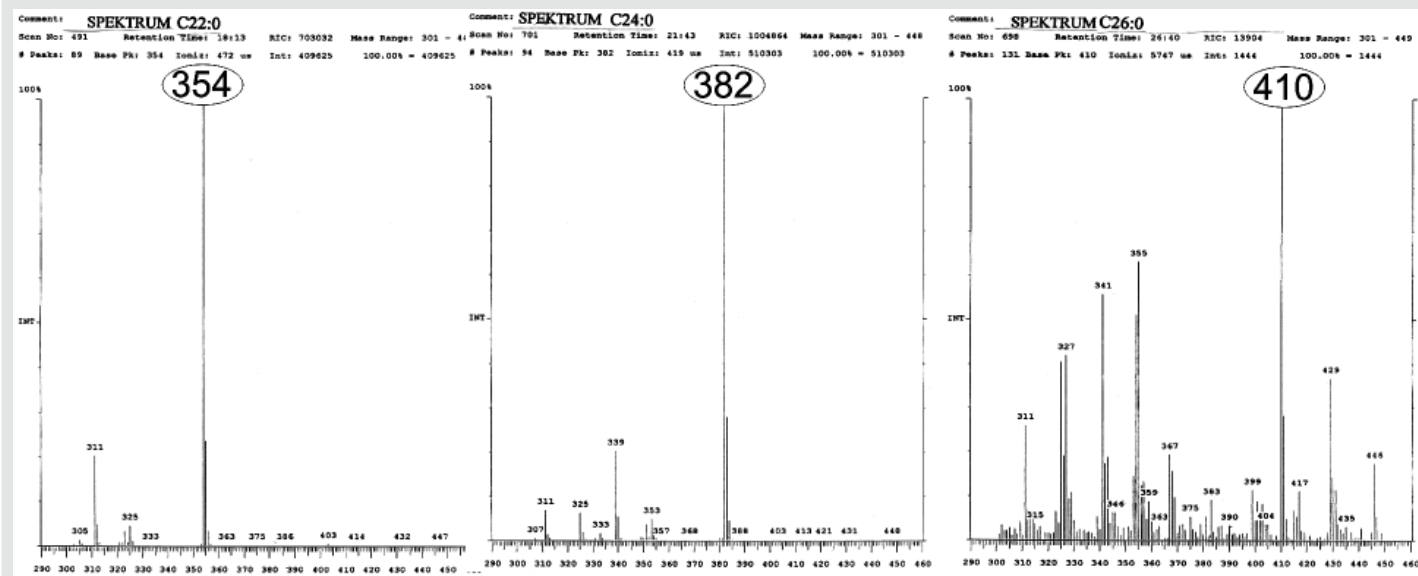
V laboratórnej diagnostike X-ALD sa využívajú viaceré abnormality a zmeny prejavujúce sa na rôznych úrovniach postihnutého organizmu. Široká škála metód umožňuje nielen postnatálnu, ale aj prenatálnu diagnostiku. Zo zmien v biochemických parametroch pri peroxizómových ochoreniach sa ru-

Obrázok 3. Fyziologické (vľavo) a patologické (vpravo) spektrum VLCFA v sére: C22:0 – behénová kyselina, C24:0 – lignocerová kyselina, C26:0 – cerotová kyselina, C27:0 – vnútorná štandarda



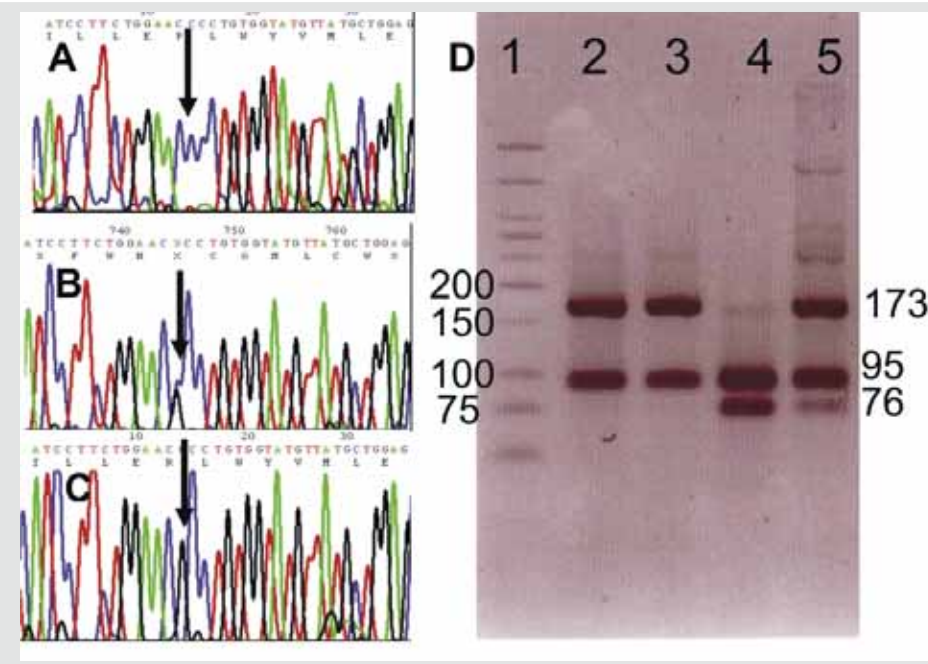
Obrázok 4. Hmotové spektra karboxylových s veľmi dlhým reťazcom:

C22:0 – kyselina behénová; C24:0 – kyselina lignocerová; C26:0 – kyselina cerotová



Obrázok 5. Molekulárna analýza ABCD1 v rodine s X-ALD:

Čiastkový chromatogram zachytávajúci novú mutáciu c.971G>C (R324P) v ABCD1, ktorá vytvára restriččné miesto pre NlaIV – šípka poukazuje na miesto mutácie. (A) hemizygotný proband, (B) heterozygotná matka probanda, (C) probandova stará matka (divý typ) (D) RFLP analýza, elektroforetogram – štiepenie 268 bp PCR produktu – mutantná alela (3 fragmenty 97, 95 a 76 bp), divý typ (2 fragmenty 173 a 95 bp). 1. dráha – DNA ladder; 2. – zdravá kontrola (divý typ); 3. – probandova stará matka; 4. – proband; 5. – probandova matka



tinne využíva v diagnostike akumulácia VLCFA v telových tekutinách. Vyšetrenie VLCFA v plazme alebo v sére u pacientov s X-adrenoleukodystrofiou je štandardný postup, ktorý si našiel veľmi skoré uplatnenie v diagnostike (12).

X-ALD sa biochemicky prejavuje hlavne zvýšenou plazmatickou hladinou kyseliny cerotovej (C26:0) a súčasne aj výrazne zvýšeným pomerom C26:0/C22:0 a taktiež C24:0/C22:0. Kvantifikáciu vyššie uvedených karboxylových kyselín je možné uskutočniť analýzou ich metylesterov pomocou ply-

novej chromatografie spriahnutej s hmotovou spektrometriou (GC-MS). GC-MS záznam s fyziologickými a patologickými hodnotami VLCFA a hmotové spektrá kyseliny behénovej (C22:0), kyseliny lignocerovej (C24:0) a kyseliny cerotovej (C26:0) sú prezentované na obrázkoch č. 3 a 4. Na kvantifikáciu VLCFA sa využívajú fragmenty, ktoré zodpovedajú molekulovým píkum (354, 382, 410) uvedených troch vyšších karboxylových kyselín.

Molekulárno-genetická diagnostika X-ALD obvykle zahŕňa sekvenčnú analýzu všetkých exónov

ABCD1 génu. V prípade ak je mutácia známa, je možné využiť aj metódu PCR (polymerázová reťazová reakcia) s následnou restričnou analýzou (RFLP – polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov). Výsledok sekvenčnej a RFLP analýzy rodiny s X-ALD je dokumentovaný na obrázku 5. Medzi skríningové metódy, ktoré môžu vytypovať mutovaný úsek génu patria dHPLC (denaturačná vysokorozlišovacia kvapalinová chromatografia) a SSCP (konformačný polymorfizmus jednovláknovej DNA). Komplikáciou pri využívaní DNA diagnostiky u pacientov a prenášačov s X-ALD je prítomnosť homológa ABCD1 génu na autozómoch. Vzhľadom na túto skutočnosť, veľkosť ABCD1 génu (10 exónov) a široké spektrum mutácií (u X-ALD viac ako 400 rôznych mutácií) sa ako ideálny javí metodický prístup, pri ktorom sa informácia mRNA prepíše pomocou enzýmu reverznej transkriptázy do kópie DNA (cDNA), u ktorej sa pomocou PCR amplifikuje menší počet dlhších úsekov génu. Tak sa napríklad u X-ALD miesto 10 úsekov môžu amplifikovať a sekvenovať iba 4 fragmenty (3).

V prenatalnej diagnostike sa taktiež môžu využiť biochemické alebo molekulárno-genetické metódy. Medzi biochemické metódy patria stanovenia koncentrácie VLCFA v amniocytoch a choriových klkoch, ale taktiež možno stanoviť schopnosť metabolizovať určité látky (značené substráty) v kultivovaných amniocytoch alebo choriových klkoch. Molekulárno-genetické metódy zahŕňajú sekvenčnú analýzu DNA alebo selektívny dôkaz už určenej mutácie.

6. Terapia X-ALD

X-ALD patrí medzi ochorenia, ktoré sú toho času terapeuticky nedostatočne zvládnuteľné. S výnimkou adrenálnej insuficiencie, u ktorej je jednoznačne indikovaná substitučná terapia kortikosteroidmi, in-

dikácia a výber formy terapie predstavuje závažné a nie vždy jednoznačne zdôvodniteľné rozhodnutie. V princípe doposiaľ aplikované terapeutické možnosti sa dajú rozdeliť na prístupy dietetické, farmakoterapeutické, imunosupresívne, bunkové transplantácie a génové terapie.

Už niekoľko rokov sa v terapii podáva Lorenzov olej – zmes glycerol-trioleátu a glycerol-trierukátu v pomere 4:1 spolu s diétou s nízkym obsahom lipidov. Táto terapia vedie k zníženiu hladín VLCFA v plazme avšak na zmeny v postihnutých tkanivách pravdepodobne nemá veľký vplyv (13). Terapia sa odporúča zvlášť u asymptomatických pacientov. Nežiaducim vedľajším efektom je trombocytopenia, ktorá sa pozorovala až u 50% pacientov. Cieľom vo farmakoterapeutickom prístupe je zvýšenie oxidácie VLCFA a úprava patobiochemického nálezu v lipidových frakciách. Experimentálne bolo potvrdené, že lovastatín zvyšuje oxidáciu C24:0 v kultivovaných X-ALD bunkách a taktiež znižuje hodnoty VLCFA v plazme pacientov s X-ALD (17). Klinický benefit uvedenej terapie zatiaľ nebol spofahlivo zhodnotený. Za odôvodnený terapeutický prístup možno považovať aplikáciu látok, ktoré vyvolávajú peroxizómovú proliferáciu. Medzi takéto potenciálne využiteľné látky v terapii X-ALD sa zaraďujú fenylbutyrát a fenylacetát. V experimentálnych modeloch tieto látky zvyšujú expresiu ALDRP génu, peroxizómovú oxidáciu VLCFA, pričom dochádza k úprave patologického nálezu aj v mozgu a v nadobličkách (7). Dostatočné

klinické skúsenosti s použitím tejto kategórie látok v terapii peroxizómových ochorení však nie sú. Imunosupresívna terapia u ALD sleduje potlačenia inflamačných procesov v mozgu, zvlášť pri rýchlej progresii cerebrálnej formy. Použitý bol β -interferón, cyklofosfamid, cyklosporín, pentoxifyllín, talidomid. Ako terapeutické postupy, ktoré vedú k najlepšiemu efektu sú uvádzané transplantácie kostnej drene a hematopoetických kmeňových buniek. Priaznivý efekt sa dosiahne zvlášť u pacientov s miernymi zmenami v NMR a klinickom náleze (10). Pri liečbe X-ALD sa realizovala aj génová substitučná terapia s retrovírusovým transferom ABCD1 génu (2). Pre klinické hodnotenie tohto prístupu nie je dostatok údajov.

7. Záver

Molekulárno-genetická a biochemická podstata X-ALD je objasnená už viac než 10 rokov. Pomerne rutinná metóda analýzy VLCFA výrazne pomohla v záchytech ochorenia v mnohých krajinách. V SR je v Centre lekárskej genetiky FNŠP Bratislava od roku 1996 zabezpečená biochemická diagnostika a od roku 2003 aj molekulárno-genetická diagnostika ALD. Kombináciou vyššie uvedených metodických prístupov sa dajú zachytiť nielen symptomatickí, ale aj asymptomatickí pacienti a ženy prenášačky. Cieľným vyšetrením príbuzných a osôb v riziku sa zachytí väčšina pacientov a prenášačov, nakoľko iba 5% prípadov tvoria mutácie vzniknuté de novo. Pri predpokladanej incidencii by mali byť v SR ročne zachytení

1 až 2 pacienti s X-ALD. Až 50% pacientov môžu byť dospelí muži s manifestáciou AMN. Práve táto skupina chýba medzi pacientmi s potvrdenou diagnózou X-ALD v SR, pravdepodobne z dôvodu, že sa na toto ochorenie nemyslí. Diferenciálnej diagnostike na X-ALD taktiež nie sú podrobení ani pacienti s primárnou adrenálnou insuficienciou. Heterogénna klinická manifestácia ochorenia sťažuje aj záchyt adultných foriem, ktoré často môžu prebiehať pod obrazom psychotických zmien a variabilných neurologických symptómov. Vzhľadom na lepšie terapeutické ovplyvnenie ochorenia u zatiaľ asymptomatických nositeľov X-ALD a pacientov s miernymi prejavmi, výrazne väčšie úsilie by malo byť vynaložené na včasnú diagnostiku. Prispeje k nej interdisciplinárna spolupráca, v ktorej má využívanie špecifických postupov klinickej a laboratórnej genetickej praxe nezastupiteľné miesto. Ich výsledkom je upresnenie individuálnej a familiárnej genetickej prognózy, odhalenie rizikových rodín, u ktorých sú v prípade potreby k dispozícii aj metódy prenatalnej diagnostiky (4).

doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.
Centrum lekárskej genetiky FNŠP Bratislava
Mickiewiczova 13, 813 69 Bratislava
e-mail: clgfn@post.sk

Literatúra:

- Aubourg P, Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Lopez J, Mandel JL. Adrenoleukodystrophy gene: unexpected homology to a protein involved in peroxisome biogenesis. *Biochimie* 1993; 75(3-4): 293–302.
- Benhamida S, Pflumio F, Dubart-Kupperschmitt A, Zhao-Emonet JC, Cavazzana-Calvo M, Rocchiccioli F, Fichelson S, Aubourg P, Charneau P, Cartier N. Transduced CD34+ cells from adrenoleukodystrophy patients with HIV-derived vector mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice. *Mol Ther* 2003; 7(3): 317–324.
- Dvořáková L, Storkanova G, Unterrainer G, Hujova J, Kmoč S, Zeman J, Hřebíček M, Berger J. Eight novel ABCD1 gene mutations and three polymorphisms in patients with X-linked adrenoleukodystrophy: The first polymorphism causing an amino acid exchange. *Hum Mutat* 2001; 18(1): 52–60.
- Đurovičková D, Lukáčová M. Genetické aspekty neurologických ochorení. *Čes a Slov Neurol Neuroch* 1996; 59/92(4): 184–188.
- Guimaraes CP, Domingues P, Aubourg P, Fouquet F, Pujol A, Jimenez-Sanchez G, Sa-Miranda C, Azevedo JE. Mouse liver PMP70 and ALDP: homomeric interactions prevail in vivo. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1689(3): 235–243.
- Chandoga J. The role of peroxisomes in intermediary metabolism. *Bratisl Lek Listy* 1995; 96(9): 465–486.
- Kemp S, Wei HM, Lu JF, Braiterman LT, McGuinness MC, Moser AB, Watkins PA, Smith KD. Gene redundancy and pharmacological gene therapy: implications for X-linked adrenoleukodystrophy. *Nat Med* 1998; 4(11): 1261–1268.
- Lazarow PB, de Duve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73(6): 2043–2046.
- Loes DJ, Hite S, Moser H, Stillman AE, Shapiro E, Lockman L, Latchaw RE, Krivit W. Adrenoleukodystrophy: a scoring method for brain MR observations. *AJNR Am J Neuroradiol* 1994; 15(9): 1761–1766.
- Mahmood A, Dubey P, Moser HW, Moser A. X-linked adrenoleukodystrophy: Therapeutic approaches to distinct phenotypes. *Pediatr Transplant* 2005; 9 (Suppl.7)(1): 55–62.
- Moser AB, Kreiter N, Bezman L, Lu S, Raymond GV, Naidu S, Moser HW. Plasma very long chain fatty acids in 3,000 peroxisome disease patients and 29,000 controls. *Ann Neurol* 1999; 45(1): 100–110.
- Moser HW, Moser AB, Frayer KK, Chen W, Schulman JD, O'Neill BP, Kishimoto Y. Adrenoleukodystrophy: increased plasma content of saturated very long chain fatty acids. *Neurology* 1981; 31(10): 1241–1249.
- Moser HW, Raymond GV, Lu SE, Muenz LR, Moser AB, Xu J, Jones RO, Loes DJ, Melhem ER, Dubey P, Bezman L, Brereton NH, Odone A. Follow-up of 89 asymptomatic patients with adrenoleukodystrophy treated with Lorenzo's oil. *Arch Neurol* 2005; 62(7): 1073–1080.
- Moser HW, Smith KD, Watkins PA, Powers J, Moser AB. X-linked Adrenoleukodystrophy; in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (eds): *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited disease*. 8th edition. New York: McGraw-Hill, 2001, pp 3257–3301.
- Mosser J, Douar AM, Sarde CO, Kioschis P, Feil R, Moser H, Poustka AM, Mandel JL, Aubourg P. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* 1993; 361(6414): 726–730.
- Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders; in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, (eds): *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited disease*. 8th edition. New York: McGraw-Hill, 2001, pp 2297–2326.
- Singh I, Khan M, Key L, Pai S. Lovastatin for X-linked adrenoleukodystrophy. *N Engl J Med* 1998; 339(10): 702–703.
- Steinberg SJ, Wang SJ, Kim DG, Mihalik SJ, Watkins PA. Human very-long-chain acyl-CoA synthetase: cloning, topography, and relevance to branched-chain fatty acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257(2): 615–621.
- Van Veldhoven PP, Just WW, Mannaerts GP. Permeability of the peroxisomal membrane to cofactors of beta-oxidation. Evidence for the presence of a pore-forming protein. *J Biol Chem* 1987; 262(9): 4310–4318.
- Wanders RJ. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab* 2004; 83(1–2): 16–27.