

Potenciálna terapia pre alkaptonúriu – príbeh spolupráce vedy, kliniky a pacientov

Andrea Zaťková¹, Helena Glasová^{1,2}, Richard Imrich^{1,3}

¹Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

²Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka Univerzita v Bratislave

³Národný ústav reumatických chorôb, Piešťany

V priebehu posledných 10 rokov sme svedkami zvýšeného záujmu o alkaptonúriu (AKU, OMIM, No. 203500), zriedkavé ochorenie, ktoré má na Slovensku primát. Kým celosvetová incidencia AKU je 1 : 250 000 až 1 : 500 000, na Slovensku sa ochorenie vyskytuje omnoho častejšie – 1 : 19 000⁽¹⁾. V januári 2019 sa skončila klinická časť projektu DevelopAKUre (7RP EÚ), ktorého súčasťou bolo klinické skúšanie SONIA 2 zamerané na testovanie efektívnosti a bezpečnosti lieku nitizinón v liečbe tohoto ochorenia. Výskum sa uskutočnil pod vedením vedcov Kráľovskej univerzitnej nemocnice v Liverpoole (RLUH) a britskej Spoločnosti pre alkaptonúriu (AKU Society). V medzinárodnom konzorciu však boli aktívne zapojené aj 2 pracoviská zo Slovenska, ako aj mnohí slovenskí pacienti, preto chceme príbeh AKU priblížiť aj čitateľom Newslabu. Výsledky štúdie SONIA 2 neboli zatiaľ publikované, ale výrobca lieku, firma SOBI (Swedish Orphan Biovitrum) už komunikovala svoj úmysel požiadať Európsku liekovú agentúru (the European Medicines Agency, EMA) o povolenie používať liek pre AKU. To dáva mnohým pacientom nádej, že AKU bude pravdepodobne jedným z ochorení, pre ktoré v roku 2020 budeme mať možnú terapiu. V súčasnosti sa tento liek vo viacerých krajinách používa mimo schválenej indikácie (off-label).

Kľúčové slová: alkaptonúria, HGD gén, porucha metabolizmu, liečba zriedkavých ochorení, nitizinón

Potential therapy for alcaptonuria – a story of cooperation among science, clinic and patients

Over the past 10 years, we have witnessed an increased interest in the rare disease alcaptonuria (AKU, OMIM, No. 203500), which has a primate in Slovakia. While the worldwide incidence of AKU is 1 : 250 000 to 1 : 500 000, the disease is much more common in Slovakia – 1 : 19000⁽¹⁾. In January 2019 a clinical part of the DevelopAKUre project (FP7 EU) finished, which included the SONIA2 study to test the effectiveness and safety of nitizinone in the treatment of the disease. The research was conducted under the leadership of scientists at the Royal University Hospital in Liverpool (RLUH) and the British Alcaptonuria Society (AKU Society). However, two teams from Slovakia as well as many Slovak patients were actively involved in the international consortium, so we want to bring a closer story of AKU to readers of Newslab. The results of the SONIA2 study have not been published yet, but the drug manufacturer, SOBI (Swedish Orphan Biovitrum) has already communicated its intention to ask the European Medicines Agency (EMA) for permission to use the medicine for AKU. It gives many patients the hope that AKU is likely to be one of the diseases, for which we will have therapy in 2020. This drug is currently being used off-label in several countries.

Keywords: alcaptonuria, HGD gene, metabolic disorder, treatment of rare diseases, nitisinone

Newslab, 2020; roč. 11 (1): 41 – 45

Z histórie výskumu AKU

AKU je ochorenie, pri ktorého definícii bol na začiatku minulého storočia prvýkrát spomenutý pojem „vrodená porucha metabolizmu“ s mendelistickou autozomálne recesívnou dedičnosťou⁽²⁾. Konkrétny metabolický blok pri AKU bol opísaný o 50 rokov neskôr ako deficit homogentizát-1,2-dioxygenázy (HGD), enzýmu zodpovedného za štiepenie kyseliny homogentizovej (HGA) v metabolizme fenylalanínu a tyrozínu⁽³⁾. O ďalších 40 rokov bola špecifikovaná genetická podstata ochorenia u človeka a gén kódujúci tento enzým bol mapovaný vďaka väzbovej analýze v rodinách aj slovenských pacientov na chromozóm 3q13.33^(4,5). Krátko nato bola opísaná štruktúra génu a identifikované prvé mutácie v rodinách

pacientov⁽⁶⁾. HGD gén pozostáva zo 14 exónov a celosvetová HGD mutačná databáza (<http://hgddatabase.cvtisr.sk>), ktorú sme vytvorili a spravujeme, do dnešných dní eviduje 212 rôznych variantov tohto génu, identifikovaných približne u 530 pacientov z celého sveta^(7,8).

Dôležitým bodom v dejinách výskumu AKU bol vznik AKU Society (2003, www.akusociety.org), prvej AKU pacientskej organizácie na svete. Od začiatku bolo jej cieľom poskytnúť podporu a informácie pacientom a rodinám, ako aj umožniť vzájomné stretávanie a spoznávanie AKU pacientov v Spojenom kráľovstve, ale aj na medzinárodnej úrovni, aby sa tak zabránilo pocitom sociálnej izolovanosti, ktorou pacienti so zriedkavými chorobami často trpia. Pri zrode tejto

organizácie bol Dr. Lakshminarayan Ranganath z Liverpoolu a pacient Robert Gregory, ku ktorým sa čoskoro pridali Dr. Nicolas Sireau, otec dvoch detí s AKU. Ich dlhoročná práca, neúnavné kampane, financovanie výskumných projektov a budovanie partnerstiev viedli aj k vytvoreniu konzorcia DevelopAKUre a série významných medzinárodných klinických skúšok SONIA 1, SONIA 2 a SOFIA v Európe (2012 – 2019), o ktorých budeme hovoriť neskôr.

V roku 2013 v Liverpoole založili tiež prvé Národné centrum AKU Roberta Gregoryho (NAC) (so sídlom v Royal University Hospital), pomenované práve po spoluzakladateľovi AKU Society. NAC odvtedy poskytuje vyšetrenia a liečbu ľuďom s AKU žijúcim v Anglicku a Škótsku. Následne bolo zriadených niekoľko sesterských spoločností AKU vo viacerých krajinách vrátane Slovenska, aby sa tak zvýšila informovanosť o AKU (Klub čiernych kostí – Slovensko, AIMAKU – Taliansko, DSAKU – Nemecko, ALCAP – Francúzsko, AKU Society Netherlands, AKU Society Asia-Pacific, AKU Society North America, Jordánska spoločnosť AKU, Brazílska spoločnosť AKU a AKU Society India). Tieto spoločnosti zohrávajú kľúčovú úlohu pri vyhľadávaní aj udržiavaní pacientov ochotných zapojiť sa do biomedicínskeho výskumu vrátane klinických štúdií, čo je náročné zvlášť pri zriedkavých ochoreniach.

AKU na Slovensku

Výskum AKU na Slovensku má svoju dlhoročnú tradíciu vďaka vyššiemu výskytu tohto ochorenia u nás. Prvý prípad AKU na Slovensku opísal prof. Siťaj v roku 1944 a v roku 1951 prof. Neuwirth objavil veľký súbor pacientov na Kysuciach, ktorý potom ďalej klinicky študovali s kolegami prof. Siťajom a prof. Urbánkom. Na základe ich práce bola v roku 1956 publikovaná veľká monografia *Alkaptonúria a ochronóza*⁽⁹⁾, ktorá predstavuje prvý veľký komplexne spracovaný súbor chorých s alkaptonúriou a ochronózou vo svete.

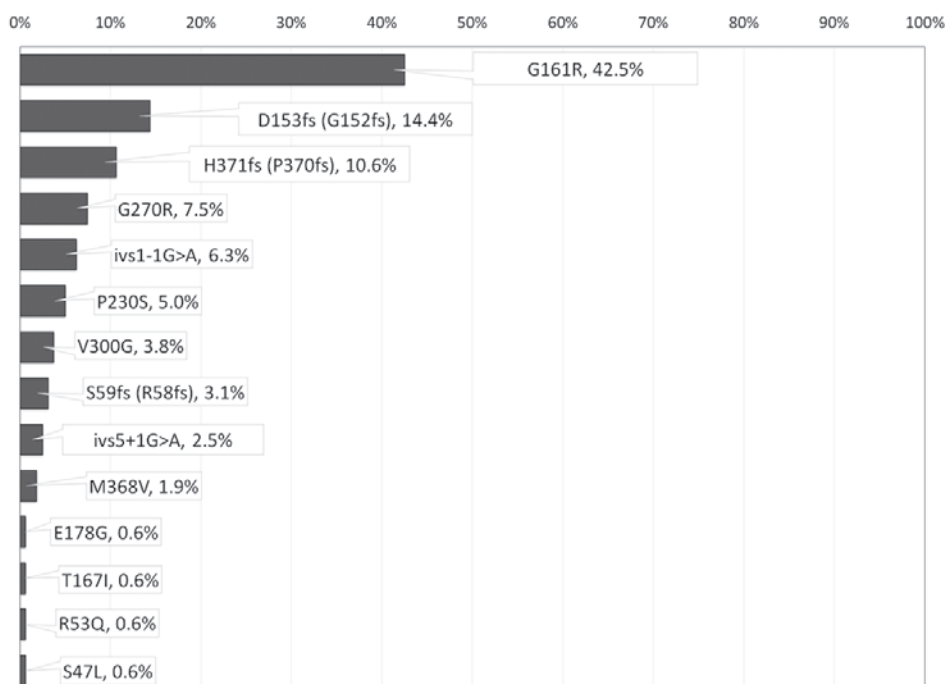
Na ich štúdie neskôr (po roku 1968) nadviazal ďalší významný slovenský pediater, zakladateľ slovenskej lekárskej genetiky, profesor Štefan Sršeň spolu s manželkou docentkou Sršňovou a ďalšími spolupracovníkmi z Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského. Skrúingom vyšetřili 610 000 obyvateľov Slovenska a do roku 1996 zaevidovali 204 pacientov s alkaptonúriou, z toho 106 detí do 15. roku života, čo predstavuje najväčší súbor detských pacientov na svete⁽¹⁰⁾. Vykonali tiež skrúing v skupine 509 192 novorodencov, na základe ktorého odhadli incidenciu AKU na Slovensku na 1 : 19 000⁽¹¹⁾. V spolupráci s laboratóriom v Münsteri (Nemecko) uskutočnili aj prvé genetické štúdie u slovenských pacientov⁽¹¹⁾.

Pri počte obyvateľov asi 5 miliónov sa odhaduje, že na Slovensku by malo v súčasnosti byť okolo 270 pacientov s AKU a asi 72 450 zdravých prenášačov. V súčasnosti sa AKU pacientom venujú jednak miestni reumatológovia, ale hlavne NÚRCH v Piešťanoch, ktorý je neformálnym centrom starostlivosti o AKU pacientov u nás.

Genetike AKU sa v laboratóriu genetiky človeka ÚKTV, BMC SAV (predtým ÚMFG SAV) venujeme od roku 1998. V spolupráci s Dr. Bošákom a neskôr prof. Rovenským z NÚRCH v Piešťanoch sme uskutočnili komplexné genetické analýzy v rodinách, ktoré ukázali, že na Slovensku máme až 14 rôznych HGD variantov spôsobujúcich toto zriedkavé ochorenie (**obrázok 1**). Tento výsledok naznačuje, že zvýšenú frekvenciu AKU u nás nemožno vysvetliť len klasickým efektom zakladateľa, ako sa predpokladalo na základe identifikácie zvýšeného výskytu ochorenia hlavne v oblasti bývalých genetických izolátov na Kysuciach⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Analýza haplotypov spojených s jednotlivými mutáciami v rodinách naznačuje, že časť mutácií bola na Slovensko importovaná počas niekoľkých migrácií európskej populácie, ktoré sa rozšířili do západnej Európy, pričom druhú skupinu tvoria mutácie, ktoré majú svoj pôvod skutočne u nás⁽¹²⁾.

Obrázok 1. Percentuálne zastúpenie 14 variantov HGD génu identifikovaných u AKU pacientov pochádzajúcich z 80 rodín zo Slovenska (160 AKU chromozómov)



Je možné, že došlo k náhodnému zvýšeniu počtu mutácií na Slovensku, pričom k ich udržaniu a rozšíreniu prispela následná genetická izolácia a genetický drift. K identifikácii vyššieho počtu pacientov s AKU na Slovensku prispel aj aktívny spôsob vyhľadávania chorých, ktorý má u nás dlhoročnú tradíciu.

Laboratórium genetiky človeka BMC SAV sa v priebehu rokov stalo medzinárodným centrom genetickej analýzy AKU pacientov. V roku 2010 sme zriadili a spravujeme už spomínanú celosvetovú HGD mutačnú databázu (<http://hgddatabase.cvtisr.sk>)^(7,8). Táto databáza obsahuje varianty identifikované v našom laboratóriu, ale aj publikovaných v celosvetovej odbornej literatúre. V databáze sú k dispozícii aj výsledky analýz predpokladaného efektu jednotlivých missense mutácií génu na štruktúru a funkciu HGD proteínu, aj jednotlivé haplotypy spojené s HGD mutáciami na Slovensku a v iných krajinách.

Klinické príznaky ochorenia a mechanizmus vzniku ochronózy

V dôsledku metabolického bloku pri AKU dochádza už od narodenia k hromadeniu kyseliny homogentízovej (HGA), ktorá sa čiastočne vylučuje močom. Keďže HGA sa oxidáciou mení na hnedočierny pigment, ako prvý príznak je väčšinou identifikované tmavnutie moču na vzduchu (homogentizúria).

Nevylúčená HGA sa v priebehu rokov postupne hromadí v tele pacientov, a to hlavne v spojivovom tkanive. To vedie neskôr k závažným multisystémovým poškodeniam, ktoré sa začínajú prejavovať už medzi 20. – 30. rokom života. Ochronóza – tmavé sfarbenie spojivových tkanív, hlavne chrupky – sa manifestuje na ušniciach, v menšom rozsahu aj na koži a očných bielkach. Akumulácia ochronotického pigmentu v chrupkách vedie postupne k bolestivej degeneratívnej ochronotickej artropatii, poškodzujúcej hlavne chrbaticu, bedrové, ramenné a kolenné kĺby. Vážnou komplikáciou je kalcifikácia aortálnych a mitrálnych chlopní. Často sa vyskytujú obličkové a prostatické kamene.

Počiatková pigmentácia je pozorovaná v jednotlivých chondrocytoch kalcifikovanej chrupky a v ich okolitom matrici⁽¹⁵⁾. Toto spôsobuje ložiskovú stuhnutosť chrupky a mení sa rozloženie zaťaženia. Následne sa ochronóza šíri smerom do hyalínovej chrupky. Pigmentovaná chrupka vytvára akoby škrupinu, ktorá je tuhá a láme sa, čo má vplyv na podkladovú trabekulárnu kosť. Ochronotická chrupka nie je schopná poskytnúť potrebnú ochranu kosti pred normálnym mechanickým zaťažením a začína jej agresívna resorpcia. Fragmenty chrupky sú prítomné aj v kostnej dreni aj v synoviálnom tkanive⁽¹⁵⁾. Ochronóza teda spôsobuje bolestivé ničenie veľkých kĺbov nesúcich váhu a fúzie stavcov. Celý proces sprevádzajú chronický slabší zápal a amyloidóza⁽¹⁶⁾. Progredujúce poškodenie vedie k invalidizácii.

Prehľad klinických príznakov pri AKU sumarizujú práce^(17,18) vrátane opisu spôsobu určenia skóre AKUSSI (Alkaptonuria Severity Score Index) používaného na hodnotenie závažnosti a progresie príznakov AKU.

Nová nádej pre terapiu AKU

Kauzálna liečba AKU momentálne ešte nie je k dispozícii. Doposiaľ boli možnosti liečby AKU limitované a zamerané

len na zmiernenie príznakov. Hlavným cieľom je kontrola bolesti, fyzioterapia a rehabilitácia a v prípade nevyhnutnej potreby náhrada poškodených kĺbov.

S cieľom znížiť hladinu HGA a jej oxidácie na ochronotický pigment bolo v minulosti odporúčané aj požívanie rôznych kombinácií antioxidantov, chýbajú však dáta potvrdzujúce efektívnosť týchto postupov. Naopak, kyselina askorbová je kofaktorom dioxygenázy 4-hydroxyfenylpyruvátu, a teda môže prispieť k zvýšeniu produkcie HGA. Pacientom sa tiež odporúča nízkoproteínová diéta, dlhodobá compliance je však problematická.

Nádej pre AKU pacientov predstavuje nitizinón. Tento liek je inhibítor enzýmu p-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenázy, zodpovedného za premenu hydroxyfenylpyruvátu na HGA. Pôvodne indikovaný na liečbu hereditárnej tyrozinémie typ 1 (Orfadin[®]) vyvinutý firmou SOBI). Už v roku 2011 publikované výsledky klinickej štúdie, uskutočnenej National Institute of Health (USA), ukázali, že nitizinón znižuje hladinu HGA v moči až o 95 %⁽¹⁹⁾. Štúdia však nepreukázala klinickú účinnosť nitizinónu, pretože sa nepotvrdilo zlepšenie pohyblivosti bedrového kĺbu AKU pacientov, čo bol hlavný výstupný parameter štúdie⁽¹⁹⁾. Vďaka aktivitám AKU spoločnosti z Anglicka, ktorá bola iniciátorom novej vlny záujmu o toto zriedkavé ochorenie, vzniklo v roku 2012 už spomínané DevelopAKUre konzorcium, ktoré s podporou projektu 7RP Európskej komisie začalo novú štúdiu s cieľom testovať nitizinón pre AKU. NÚRCH v Piešťanoch, RLUH v Liverpoole a Hospital Necker v Paríži boli 3 centrami klinického skúšania, v ktorých prebiehali postupne 3 štúdie – SONIA 1, SONIA 2 a SOFIA (<http://www.developakure.eu/>). Na projekte sa podieľalo aj oddelenie genetiky človeka ÚKTV, BMC SAV, ktoré bolo zodpovedné za mutačnú analýzu u všetkých pacientov zapojených do štúdií.

Prvá štúdia projektu, SONIA 1, bola realizovaná v Liverpoole a v Piešťanoch. Išlo o krátku štúdiu, trvala 4 týždne a určila dávku 8 mg nitizinónu denne ako nejefektívnejšiu na zníženie koncentrácie HGA v moči pacientov⁽²⁰⁾.

Do dlhodobej štúdie SONIA 2 bolo už zapojených 138 pacientov a jej cieľom bolo preukázať, že nitizinón je efektívny a bezpečný na použitie u AKU pacientov. Kontrolnú skupinu 69 pacientov, ktorí boli bez liečby, porovnali so 69 pacientmi, ktorí počas 4 rokov užívali 10 mg nitizinónu denne. Pacienti z oboch skupín pravidelne navštevovali centrá klinického skúšania a mali sledované viaceré parametre, ktoré sa na záver štúdie porovnali. Definitívne výsledky tejto štúdie, ktorej klinická časť sa skončila v januári 2019, ešte neboli publikované, no výrobca lieku, SOBI, už komunikoval svoj úmysel požiadať Európsku liekovú agentúru (EMA) o povolenie používať liek pre AKU.

Doterajšie skúsenosti s nitizinónom, či už v štúdiu SONIA 2, alebo v prípade off-label liečby, ukazujú, že je nevyhnutný multiodborový prístup k manažmentu pacientov s AKU. Okrem prirodzenej úlohy reumatológa a klinického genetika je potrebné komplexný prístup doplniť o kvalitné nutričné poradenstvo. Pre možný výskyt keratopatie počas liečby nitizinónom ako hlavného a očakávaného nežiaduceho účinku, bude potrebné zaviesť pravidelné biochemické monitorovanie koncentrácie tyrozínu v sére a sledovanie pacientov očným lekárom. Vznik keratopatie sa dáva do súvislosti práve so zvýšením hladiny tyrozínu počas liečby nitizinónom, no

presný mechanizmus nie je úplne jasný. Z pohľadu klinického výskumu bude preto potrebné zamerať sa na hľadanie biomarkerov vzniku keratopatie.

Otvorená prierezová štúdia SOFIA, do ktorej sa zapojilo 32 pacientov s AKU a 30 kontrolných jedincov, prebiehala len v Liverpoole. Cieľom štúdie bolo zistiť, v akom veku sa poškodenie pri AKU začína, čo sa týka klinicky manifestovaných aj subklinických prejavov ochorenia⁽²¹⁾. Primárnym výsledkom bol sledovanie prítomnosti ochronózy v ušnej biopsii. Sekundárne výsledky zahŕňali analýzu fotografií očí a uší, koncentráciu HGA v sére a v moči aj markery poškodenia/zápalu/oxidácie tkanív, MRI, test chôdze, kvality života a index závažnosti skóre alkaptonúrie (qAKUSSI). Ochronóza v tkanive biopsie z ucha bola prítomná už u 20-ročného pacienta, čo naznačuje, že subklinické prejavy sú pozorovateľné ešte pred týmto vekom.

V súčasnosti prebiehajú prípravy na pediatrickú klinickú štúdiu. Informácie z týchto štúdií budú dôležité pre rozhodovanie, v akom veku treba začať liečbu, aby sa zabránilo rozvoju príznakov.

Zvierací model AKU

Dôležitú úlohu vo výskume AKU zohralo vytvorenie experimentálneho modelového organizmu – AKU myši. Využíva sa pri štúdiu patofyziológie AKU a tiež efektu potenciálnej liečby. V roku 2014 bol publikovaný nový myšší model AKU⁽²²⁾, pri ktorom už od začiatku života možno pozorovať lineárne stúpajúcu ochronózu, pričom priemerné celoživotné hladiny HGA v plazme zostávajú relatívne konštantné. Je zaujímavé, že u týchto myši nebolo pozorované konečné/terminálne štádium pigmentácie kalcifikovaných a hyalínových chrupiek, charakteristické pre AKU u ľudí, čo naznačuje, že ochronóza u myši reprezentuje skoré štádiá prítomné v kĺboch u človeka s AKU. Celoživotné podávanie nitizínou týmto AKU myšiam viedlo k 88% zníženiu plazmatického

HGA a k úplnému blokovaniu pigmentácie chondrocytov, čím sa potvrdilo, že ak sa nitizín začne podávať včas, môže zastaviť priebeh ochronózy^(22,23).

Variabilita závažnosti ochorenia

U pacientov s AKU bola pozorovaná variabilita v závažnosti ochorenia. Už v roku 2000 Rodriguez a kol.⁽²⁴⁾ pozorovali rozdielnu reziduálnu aktivitu HGD enzýmu nesúceho rôzne missense mutácie, čo sme následne potvrdili aj v našej práci⁽⁶⁾. Predpokladalo sa, že práve rozdielna reziduálna aktivita určuje aj rozdiely v závažnosti ochorenia. V rámci štúdie SONIA 2 sme preto uskutočnili analýzu korelácie medzi genotypom a fenotypom, konkrétne u pacientov s mutáciou G161R, pri ktorej je zachované len 1 % aktivity enzýmu, v porovnaní so skupinou nesúcou mutácie M368V a A122V, ktoré, naopak, mali asi až 30 % aktivity divokého typu⁽⁶⁾. Hoci medzi oboma skupinami bol pozorovaný rozdiel v hladine HGA vylučovanej močom za 24 h, kompenzovanej na príjem proteínov, tento rozdiel sa však neprejavil do významných rozdielov v sledovaných klinických parametroch⁽⁶⁾.

To znamená, že pri AKU sa nepotvrdil priamy efekt typu mutácie *HGD* génu na variabilitu fenotypu ochorenia. Pretože je pozorovaná vysoká intra- aj interindividuálna variabilita hladín HGA v moči, predpokladáme, že je závislá hlavne od celkového príjmu bielkovín v strave (t. j. tyrozínu) a od renálnych funkcií⁽²⁵⁾.

Nevyklúčujeme však, že môžu prispievať aj ďalšie faktory – genetické alebo biomechanické. V budúcnosti sa bude treba zamerať na identifikáciu týchto potenciálnych faktorov, a to analýzou súrodeneckých párov, u ktorých je rozdielnosť fenotypu pozorovaná. Zároveň bude potrebné identifikovať faktory, ktoré prispievajú k rozvoju keratopatie počas liečby nitizínom a vypracovať komplexný protokol manažmentu pacientov s AKU.

LITERATÚRA

1. Srsen S, Koska L, Kapralik I. [Alkaptonuria in the Upper Hron Region in Slovakia (author's transl)]. *Cas Lek Cesk* 1978; 117(49): 1517-1522.
2. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria: a study in chemical individuality. *Lancet* 1902; 2: 1616-1620.
3. La Du BN. Alkaptonuria. In: Scriver CR, Beauder AL, Sly W, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 7th ed. New York: McGraw Hill; 1958: 1371-1386.
4. Janocha S, Wolz W, Srsen S, et al. The human gene for alkaptonuria (AKU) maps to chromosome 3q. *Genomics* 1994; 19(1): 5-8.
5. Pollak MR, Chou YH, Cerda JJ, et al. Homozygosity mapping of the gene for alkaptonuria to chromosome 3q2. *Nat Genet* 1993; 5(2): 201-204.
6. Fernández-Cañón JM, Granadino B, Beltrán-Valero de Bernabé D, et al. The molecular basis of alkaptonuria. *Nat Genet* 1996; 14(1): 19-24.
7. Zatkova A, Sedlackova T, Radvansky J, et al. Identification of 11 Novel Homogentisate 1,2-Dioxygenase Variants in Alkaptonuria Patients and Establishment of a Novel LOVD-Based HGD Mutation Database. *JIMD Reports* 2012; 4: 55-65.
8. Ascher DB, Spiga O, Sekelska M, et al. Homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD) gene variants, their analysis and genotype-phenotype correlations in the largest cohort of patients with AKU. *Eur J Hum Genet* 2019; 27(6): 888-902.
9. Sifaj Š, Červeňanský J, Urbánek T. Alkaptonúria a ochronóza. Vol 1. Bratislava: Slovenská akadémia vied; 1956.
10. Srsen S, Muller CR, Fregin A, Srsnova K. Alkaptonuria in Slovakia: thirty-two years of research on phenotype and genotype. *Mol Genet Metab* 2002; 75(4): 353-359.
11. Gehrig A, Schmidt SR, Muller CR, Srsen S, Srsnova K, Kress W. Molecular defects in alkaptonuria. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 76(1-2): 14-16.
12. Zatkova A, Beltrán-Valero de Bernabé D, Polakova H, et al. High frequency of alkaptonuria in Slovakia: evidence for the appearance of multiple mutations in HGO involving different mutational hot spots. *Am J Hum Genet* 2000; 67(5): 1333-1339.
13. Zatkova A, Beltrán-Valero de Bernabé D, Polakova H, et al. Allele heterogeneity of alkaptonuria causing mutations and possible reasons for high incidence of this disease in Slovakia. *Lekarsky Obzor* 2000; 49: 347-352.
14. Zatkova A. An update on molecular genetics of Alkaptonuria (AKU). *J Inherit Metab Dis* 2011; 34(6): 1127-1136.
15. Gallagher JA, Taylor AM, Boyde A, et al. Recent advances in understanding the pathogenesis of ochronosis. *Reumatologia* 2012; 50(4): 316-323.
16. Millucci L, Braconi D, Bernardini G, et al. Amyloidosis in alkaptonuria. *J Inherit Metab Dis* 2015; 38(5): 797-805.
17. Ranganath LR, Cox TF. Natural history of alkaptonuria revisited: analyses based on scoring systems. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34(6): 1141-1151.
18. Ranganath LR, Norman BP, Gallagher JA. Ochrotonic pigmentation is caused by homogentisic acid and is the key event in alkaptonuria leading to the destructive consequences of the disease-A review. *J Inherit Metab Dis* 2019; 42(5): 776-792.
19. Introne WJ, Perry MB, Troendle J, et al. A 3-year randomized therapeutic trial of nitisinone in alkaptonuria. *Mol Genet Metab* 2011; 103(4): 307-314.

20. Ranganath LR, Milan AM, Hughes AT, et al. Suitability Of Nitisinone In Alkaptonuria 1 (SONIA 1): an international, multicentre, randomised, open-label, no-treatment controlled, parallel-group, dose-response study to investigate the effect of once daily nitisinone on 24-h urinary homogentisic acid excretion in patients with alkaptonuria after 4 weeks of treatment. *Ann Rheum Dis* 2016; 75(2): 362-367.
21. Cox TF, Psarelli EE, Taylor S, et al. Subclinical Ochronosis Features In Alkaptonuria: A Cross-Sectional Study. *BMJ Innovations* (in press). 2019.
22. Preston AJ, Keenan CM, Sutherland H, et al. Ochronotic osteoarthropathy in a mouse model of alkaptonuria, and its inhibition by nitisinone. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(1): 284-289.
23. Keenan CM, Preston AJ, Sutherland H, et al. Nitisinone Arrests but Does Not Reverse Ochronosis in Alkaptonuric Mice. *JIMD Rep* 2015; 24: 45-50.
24. Rodriguez JM, Timm DE, Titus GP, et al. Structural and functional analysis of mutations in alkaptonuria. *Hum Mol Genet* 2000; 9(15): 2341-2350.
25. Ranganath LR, Khedr M, Milan AM, et al. Nitisinone arrests ochronosis and decreases rate of progression of Alkaptonuria: Evaluation of the effect of nitisinone in the United Kingdom National Alkaptonuria Centre. *Mol Genet Metab* 2018; 125(1-2): 127-134.



Mgr. Andrea Zatková, PhD.
Ústav klinického a translačného výskumu, Biomedicínske centrum SAV
Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava
e-mail: andrea.zatkova@savba.sk