

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Neurofibromatóza typu 1

Diana Fluksová

Bakalářská práce

2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Neurofibromatosis type 1

Diana Fluksová

Bachelor work

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Diana Fluksová**
Osobní číslo: **C15405**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Neurofibromatóza typu 1**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se neurofibromatózy typu 1.
2. V úvodu krátce popsat příčiny vzniku tohoto onemocnění a jeho charakteristiku.
3. V další části se zaměřit na diagnostiku, klinické projevy nemoci, výskyt v populaci a možnosti terapie.
4. V závěru krátce nastínit prognózu.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 28. 6. 2018

.....

Diana Fluksová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a rady při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině za podporu při studiu.

ANOTACE

Neurofibromatóza typu 1 je autosomálně dominantní onemocnění charakterizované skvrnami bílé kávy, četnými neurofibromy, Lischovými noduly, axilárními a inguinálními pihami. Bakalářská práce je zaměřená na charakteristiku tohoto onemocnění. Tato práce nejprve popisuje příčiny vzniku, dále se zaměřuje na klinické projevy, diagnostiku, léčbu a poslední část je věnována prevalenci a výskytu neurofibromatózy typu 1 v České republice i ve světě.

KLÍČOVÁ SLOVA

Neurofibromatóza typu 1, klinické projevy, diagnostika, léčba, prevalence

TITLE

Neurofibromatosis type 1

ANNOTATION

Neurofibromatosis type 1 is autosomal dominant disease characterized by café-au-lait macules, multiple neurofibromas, iris Lisch nodules, axillary and inguinal freckling. The bachelor thesis focuses on the characterization of the disease. Firstly, the thesis describes its causes. Then, it focuses on clinical manifestations, diagnostics, and treatment. Lastly, it deals with prevalence and incidence on neurofibromatosis type 1 in the Czech Republic and the world.

KEYWORDS

Neurofibromatosis type 1, clinical manifestation, diagnostics, treatment, prevalence

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Lokalizace genu NF1	15
Obrázek 2 CALM a malé neurofibromy	18
Obrázek 3 Kožní neurofibrom	19
Obrázek 4 Podkožní neurofibrom	20
Obrázek 5 Plexiformní neurofibrom	21
Obrázek 6 Lischovy noduly	22
Obrázek 7 Metoda MLPA	35
Obrázek 8 Elektroforeogram	35
Obrázek 9 Zastoupení jednotlivých syndromů predisponujících k nádorům u pacientů KDO FN Brno	43

SEZNAM ZKRATEK

CALM	skvrny bílé kávy (Café-au-lait Macule)
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cDNA	komplementární DNA
CEP	centromerická sonda (chromosome enumeration probes)
CGH	komparativní genomová hybridizace (comparative genomic hybridization)
CNS	centrální nervová soustava
DGGE	elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (denaturing gradient gel electrophoresis)
dHPLC	denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescent <i>in situ</i> hybridisation)
GAP	GTPázu aktivující proteiny
gDNA	genomická DNA
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
kbp	kilobáze (kilobase pair)
kDa	kilodalton
LSI	lokusově specifická sonda (locus-specific identifiers)
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinase)
MLPA	multiplexová ligačně dependentní amplifikace prób (multiplex ligation-dependent probe amplification)
MPNST	maligní nádor z pochvy periferního nervu (malignant peripheral nerve sheath tumor)

MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)
mRNA	messenger RNA
mTOR	cílová molekula pro účinek rapamycinu u savců (mammalian target of rapamycin)
NF	neurofibromatóza
NF1	neurofibromatóza typu 1
NF2	neurofibromatóza typu 2
NGS	sekvenování nové generace (next-generation sequencing)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PNS	periferní nervová soustava
PTT	test na zkrácené proteiny (protein truncation test)
SSCP	jednořetězcový konformační polymorfismus (single-strand conformation polymorphism)
TGGE	gelová elektroforéza s teplotním gradientem (temperature gradient gel electrophoresis)
WCP	celochromozomová sonda (whole chromosome paints)

OBSAH

Úvod.....	13
1 Neurofibromatóza typu 1	14
1.1 Historie.....	14
1.2 Dědičnost.....	14
1.2.1 Gen NF1.....	15
1.2.2 Neurofibromin	16
1.3 Diagnostická kritéria	17
1.3.1 Skvrny bílé kávy	18
1.3.2 Axilární a inguinální pihy	18
1.3.3 Neurofibromy.....	18
1.3.4 Gliom optického nervu	21
1.3.5 Lischovy noduly	21
1.3.6 Kostní dysplazie.....	22
1.4 Další klinické projevy	22
1.4.1 Kardiovaskulární abnormality	22
1.4.2 Kostní abnormality	23
1.4.3 Nádory	23
1.4.4 Neurologické projevy	24
1.4.5 Autoimunitní onemocnění	24
1.4.6 Poruchy pubertálního vývoje.....	24
1.4.7 Psychické problémy	24
1.4.8 Těhotenství a antikoncepce.....	24
1.5 Věk při výskytu jednotlivých symptomů	26
2 Diagnostika	27
2.1 Molekulární diagnostika.....	28
2.1.1 Polymerázová řetězová reakce.....	30

2.1.2	Test na zkrácené proteiny	30
2.1.3	Sekvenování.....	30
2.1.4	Jednořetězcový konformační polymorfismus	31
2.1.5	Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu	32
2.1.6	Gelová elektroforéza s teplotním gradientem.....	32
2.1.7	Denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie.....	32
2.1.8	Fluorescenční in situ hybridizace	33
2.1.9	Komparativní genomová hybridizace	33
2.1.10	Southern blotting.....	34
2.1.11	Multiplexová ligačně dependentní amplifikace práb.....	34
2.2	Diferenciální diagnostika	36
2.2.1	CALM s rodinným výskytem	36
2.2.2	Neurofibromatóza typu 2	36
2.2.3	Legiusův syndrom.....	36
2.2.4	Proteův syndrom	37
2.2.5	McCuneův-Albrightův syndrom.....	37
2.2.6	Noonanův syndrom.....	37
2.2.7	Watsonův syndrom	37
2.2.8	Mozaiková forma	37
3	Léčba.....	39
3.1	Monitorování pacienta	39
3.2	Léčba klinických projevů	40
3.3	Cílená léčba.....	41
4	Prevalence a výskyt	43
	Závěr	45
	Použitá literatura	46

ÚVOD

Druhou nejčastější příčinou úmrtí v ČR jsou nádorová onemocnění, na která umírá ročně více než 27 000 osob. Většina nádorových onemocnění se vyskytuje náhodně, ale 5-10 % představují dědičné nádorové syndromy, které zvyšují pravděpodobnost vzniku rakoviny již v raném věku ve srovnání s celkovou populací [1,2].

Mezi dědičné nádorové syndromy řadíme také neurofibromatózu typu 1 (NF1). Jedná se o autosomálně dědičné onemocnění, jedno z nejrozšířenějších genetických onemocnění na celém světě. Onemocnění popsané v roce 1882 německým patologem Frederickem von Recklinghausenem je způsobené mutací genu NF1 lokalizovaném na chromozomu 17. Gen NF1 je tumor-supresorový gen, jehož produkt neurofibromin se uplatňuje při regulaci buněčného cyklu a inaktivací dochází k nekontrolované proliferaci buněk. U 50 % případů se setkáváme u pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou, v dalších 50 % jsou příčinou mutace *de novo*. NF1 je charakterizována skvrnami bílé kávy, četnými neurofibromy, Lischovými noduly, axilárními a inguinálními pihami. V mé práci jsou popsána nejen diagnostická kritéria stanovená na konferenci Národního institutu pro zdraví, ale také další klinické projevy, poněvadž NF1 má širokou škálu klinických projevů. Diagnostika je stanovena na základě diagnostických kritérií a doplňkem je molekulární diagnostika, která je poměrně obtížná. V této práci jsou ve stručnosti popsány metody, kterými se NF1 stanovuje.

Hlavním cílem bakalářské práce je podat teoretickou rešerši o onemocnění NF1.

1 NEUROFIBROMATÓZA TYPU 1

Neurofibromatóza je heterogenní skupina onemocnění spojená s výskytem nádorů centrálního a periferního nervového systému. Nejčastějšími typy NF jsou neurofibromatóza typu 1 a neurofibromatóza typu 2 (NF2). NF1 je onemocnění způsobené přítomností mutace v genu NF1 umístěném na chromozomu 17. Dalším typem, méně častým, je NF2, která je podmíněná mutací genu NF2 nacházejícího se na chromozomu 22. Mimoto se odlišují klinickým obrazem a věkem při manifestaci onemocnění [3,4].

Neurofibromatóza typu 1, známá také jako Recklinghausenova nemoc, je autosomálně dominantní choroba. NF1 má široké spektrum klinických projevů od pigmentových abnormalit (CALM, Lischovy noduly), nádorů periferní (neurofibromy, maligní nádory pochev periferních nervů, MPNST) a centrální nervové soustavy (gliomy optického nervu), kostních abnormalit, vaskulopatií až po další typy nádorového bujení. Poruchy učení, deficity sociálního vnímání a pozornosti se objevují u více než 80 % dětí s NF1. Symptomy NF1 se objevují již v raném dětství, polovina případů vykazuje charakteristické klinické vlastnosti do 1. roku života, 97 % případů před 8. rokem života. Riziko malignity je u NF1 zvýšené o 2,5 až čtyřnásobek oproti celkové populaci [3,5,6].

1.1 Historie

NF1 pravděpodobně existovala již v dávných dobách, čemuž nasvědčuje umění a literatura z 3. století, ve které se objevovaly popisy odpovídající tomuto onemocnění. Joseph Merrick, známý pod jménem Sloní muž, se narodil v Anglii v roce 1862. Joseph trpěl kostními abnormalitami, deformujícími nádory a vystupoval jako cirkusová atrakce. Ačkoli většinu času se předpokládalo, že měl NF1, nyní se spekuluje o Proteově syndromu. V roce 1882 publikoval německý patolog Frederick von Recklinghausen monografii, kde popsal onemocnění i vznik neurofibromů. Podle autora je také NF1 označována jako Recklinghausenova choroba. U pacientů s NF1 byly poprvé popsány Lischovy noduly rakouským oftamologem Karlem Lischem v roce 1937. O pár let později, 1956, Frank Crowe a jeho kolegové rozpoznali NF1 jako dědičné onemocnění. 1982 klasifikoval Riccardi neurofibromatózu do osmi kategorií. Ty nebyly všeobecně akceptovány, avšak některé přetrvávají. Vedle typu 1 a 2 se zachoval typ 5 – segmentální forma [3,4,7,8].

1.2 Dědičnost

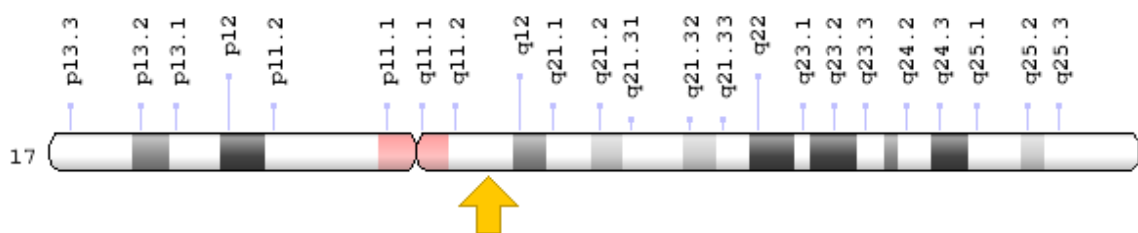
NF1 je autosomálně dominantní onemocnění způsobené spektrem mutací ovlivňujících gen NF1. Má jednu z nejvyšších rychlostí spontánní mutace mezi genetickými

onemocněními. U 50 % pacientů se setkáváme s pozitivní rodinnou anamnézou, dalších 50 % představuje spontánní mutace. Nemoc postihuje všechny bez ohledu na pohlaví a rasu. Pacienti se stejnou mutací mohou mít velmi odlišné klinické příznaky onemocnění. Penetrace je 100 % [9,10].

1.2.1 Gen NF1

Gen NF1 je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 17 (17q11.2, obr. 1), byl identifikován v roce 1990 a počáteční studie NF1 genu identifikovaly pouze 30 až 65 % mutací zárodečné linie u jasně postižených jedinců. Skládá se z 57 exonů a 350 kbp genomové DNA a patří mezi jeden z největších genů v lidském genomu. Jedná se o tumor supresorový gen, který je klíčovou signální molekulou při regulaci růstu buněk. Zvýšené riziko vývoje rakoviny u jedinců s poruchami tumor supresorového genu vysvětluje Knudsonova teorie dvojího zásahu. Jedinci bez NF1 mají dvě funkční kopie genu NF1 a riziko vzniku nádoru je podstatně nižší. Pacienti s NF1 se narodí již s jednou mutovanou, tedy lze hovořit o prvním záchytu, a jednou funkční kopií genu NF1. Později získaná somatická mutace, tedy již druhý zásah, v dříve fungujícím genu NF1 vede k úplné inaktivaci obou kopií, ztrátě exprese neurofibrominu a zvýšené proliferaci této buňky [3,11-13].

Gen NF1 obsahuje dva velké introny, 1 a 27b, každý obsahuje více než 60 kb. V intronu 27b se nacházejí tři malé geny EVI2A, EVI2B a OMG. EVI2A a EVI2B kódují proteiny, které se podílejí na rozvoji leukémie u myší. Produkt genu OMG je membránový glykoprotein exprimovaný v lidském centrálním nervovém systému během procesu myelinizace. U těchto proteinů se předpokládá, že mají malou nebo žádnou interakci s neurofibrominem [3,5,11].



Obrázek 1 Lokalizace genu NF1 [14]

1.2.1.1 Mutace

NF1 je spojena s přítomností mutací v genu NF1. Mutační rychlost je jedna z nejvyšších, a to 1×10^{-4} /gametu/ generaci. Mutace, které byly doposud zjištěné, jsou náhodně rozmístěné v rámci genu a nejsou lokalizovány v oblastech „hot spots“. Mutace jsou

běžné u exonů 3, 5 a 27, nicméně se nejedná se o „hot spots“ oblasti. V genu NF1 bylo zjištěno více než 1485 mutací. Převážná část mutací je mutace ztráty funkce, jedná se o mutace měnící smysl, nesmyslné mutace, inserce, delece, sestřihové a velké genové přestavby. Většina zárodečných mutací vede k předčasnému vzniku terminačního kodonu. Genetická analýza ukázala, že bodové mutace se často vyskytují na chromozomu otcovského původu, zatímco mikrolece jsou častější na mateřském [3,15].

1.2.1.2 Korelace fenotypu a genotypu

Fenotypová variabilita, dokonce i v rámci jedné rodiny, je velmi široká. Korelace mezi genotypem a fenotypem je nejasná, je popsáno jen několik mutací, které konkrétně ovlivňují fenotyp pacientů. Delece celého genu NF1 je spojená se vznikem kožních neurofibromů, častějšími a závažnějšími kognitivními abnormalitami, nadměrným růstem a dysmorfními rysy obličeje. 3 bp delece exonu 17 je spojena s typickými pigmentovými vlastnostmi NF1, ale bez výskytu kožních nebo plexiformních neurofibromů. Duplikace NF1 lokusu vede k intelektuálnímu postižení a epilepsii, bez dalších klinických příznaků. U pacientů s mikrolecí NF1 dochází k rozvoji velkého počtu neurofibromů již v raném věku a mají zvýšené riziko vzniku MPNST [6,9,11].

1.2.2 Neurofibromin

Gen NF1 kóduje cytoplazmatický protein neurofibromin, obsahující 2818 aminokyselin, s molekulovou hmotností 280 kDa. Neurofibromin je exprimovaný v mnoha tkáních, ale především v neuronech, Schwannových buňkách, oligodendrocytech a leukocytech. Jiné tkáně také exprimují neurofibromin, ale v podstatně nižších koncentracích. Ztrátou funkce dochází ke zvýšené buněčné proliferaci a vývoji nádorů [3,10].

Neurofibromin patří mezi GTPázu aktivující proteiny (GAP) a působí především na negativní regulaci aktivity Ras proteinu. Aktivita Ras-Gap je zprostředkována GAP-doménou lokalizovanou v centrální části neurofibrominu. Protein genu NF1 aktivuje Ras-GTPázu, která urychlí konverzi aktivního Ras-GTP na neaktivní Ras-GDP, což vede k inaktivaci Ras a následné inhibici Ras/MAPK dráhy. Ztráta funkce nebo snížená hladina neurofibrominu vede ke zvýšení Ras/MAPK dráhy a tím způsobí nekontrolovanou proliferaci buněk [3,11,16].

Zvýšená hladina Ras-GTP stimuluje PI3K/AKT/mTOR signální dráhu, která chrání buňku před apoptózou. Ztrátou funkce neurofibrominu dochází k nepřetržité aktivaci této dráhy a tím dochází k rezistenci k apoptóze a zvýšené buněčné proliferaci [3,11].

Vedle inhibice funkce proteinů Ras, neurofibromin také pozitivně reguluje intracelulární hladinu cAMP. V případě zvýšení hladiny cAMP dochází ke snížení buněčného růstu. Neurofibromin je v mozku nalézán ve spojení s mikrotubuly. Mutace v genu NF1 přeruší spojení neurofibrominu s mikrotubuly, což může vést ke kognitivním poruchám a poruchám učení. Na myších modelech bylo zjištěno, že neurofibromin je nezbytný pro normální embryonální vývoj u savců a nedostatek neurofibrominu je smrtelný. Embrya bez funkčního genu NF1 zemřela mezi 12,5 a 13,5 dnem embryonálního vývoje, což poukazuje na jeho roli ve vývoji organismu [3,6,17].

Mezi dvě hlavní izoformy neurofibrominu řadíme typ 1 a 2. Neurofibromin typu 1 má význam v regulaci aktivity Ras a je vyjádřen převážně v mozku. U neurofibrominu typu 2, nazývaného GRD2, je regulační schopnost GAP snížena. Neurofibromin typu 2 je exprimován ve Schwannových buňkách a studie s využitím myších modelů prokázala, že je nezbytný pro učení a paměť. Neurofibrominy typu 3 a 4 jsou exprimovány především v kosterní a srdeční svalovině a u těchto izoform se předpokládá, že jsou nutné pro vývoj svalů a srdce. Vedle izoform 1-4 existuje neurofibromin 9a, účastníci se především při paměťových mechanismech, a izoforma s inzercí exonu 10a-2 [6,17].

1.3 Diagnostická kritéria

Diagnostická kritéria byla stanovena na konferenci Národního institutu pro zdraví v roce 1987 a aktualizována byla v roce 1997. Pro určení diagnózy NF1 je nutná přítomnost minimálně dvou z následujících klinických rysů [18]:

- šest nebo více skvrn bílé kávy o průměru větším než 5 mm u dětí, větší než 15 mm u dospělého pacienta
- dva a více neurofibromů nebo jeden plexiformní neurofibrom
- axilární nebo inguinální pihy
- gliom optického nervu
- dva nebo více hamartomů duhovky (Lischovy noduly)
- charakteristické kostní dysplazie
- NF1 u příbuzných 1. stupně

Z těchto klinických projevů se již v raném dětství vyskytují CALM, ostatní se obvykle objevují v pozdějším věku, z tohoto důvodu může být diagnostika u malých dětí problematická. Jedna a více skvrn bílé kávy se vyskytuje zhruba u 10 % populace. Velikost, počet a umístění CALM neodpovídají závažnosti NF1, ani lokaci budoucího neurofibromu.

Ve věku 3-5 let jsou dalším nejčastějším příznakem pihy nejdříve v oblasti třísel, později v podpaží. V období do 6 let (do 10 let) se projevují gliomy optiku, v pozdějším věku zřídka. U dospělých se vyskytují Lischovy noduly [4,19].

1.3.1 Skvrny bílé kávy

Nejčastějším a nejčasnějším příznakem NF1 jsou skvrny bílé kávy, které se mohou objevovat již při narození nebo se vyvíjí během prvních dvou let života. CALM (obr. 2) jsou hnědé, ostře ohraničené skvrny. Histologicky se jedná o hyperpigmentaci bazální membrány epidermidis s keratinocyty s normálním nebo lehce zvýšeným počtem melanocytů. Jedním z diagnostických kritérií je přítomnost více než šesti CALM o průměru větším než 5 mm u dětí a větší než 15 mm u dospělého pacienta. Počet těchto skvrn nesouvisí se závažností onemocnění [9,20-22].



Obrázek 2 CALM a malé neurofibromy [10]

1.3.2 Axilární a inguinální pihy

Tyto pigmentové abnormality jsou druhým nejčastějším příznakem po CALM, který se objevuje u dětí. Axilární a inguinální pihy jsou klinicky i histologicky podobné CALM s výjimkou velikosti. Tyto pihy jsou obvykle malé a nejčastěji se nacházejí v oblasti podpaží a třísel, avšak mohou se vyskytovat v oblastech nad víčky, kolem krku a pod prsy [9,20-22].

1.3.3 Neurofibromy

Neurofibromy jsou benigní nádory vznikající ze Schwannových buněk, které obklopují periferní nervy. Klinicky se vyskytují jako boule nebo uzlíky růžové barvy na trupu, končetinách, hlavě nebo krku, mohou být také umístěné hluboko v těle. Jejich počet

u pacientů s NF1 se může pohybovat od několika desítek až po několik tisíc. V dětství je výskyt vzácný, obvykle se rozvíjejí kolem puberty a frekvence se s věkem zvyšuje. Rychlý nárůst počtu a velikosti neurofibromů je zaznamenán u žen během těhotenství. Existují 4 podtypy: kožní, podkožní, plexiformní a spinální [9,20-22].

1.3.3.1 Kožní neurofibromy

Kožní neurofibromy (obr. 3) vycházejí z nervových zakončení kožních nervů. Poprvé se objevují kolem puberty a počet se zvyšuje s věkem. Jedná se o tumory benigní, které se nemění na zhoubné nádory [7,23].



Obrázek 3 Kožní neurofibrom [7]

1.3.3.2 Podkožní neurofibromy

Podkožní neurofibromy (obr. 4) jsou uloženy hluboko v kůži, jsou pevné a kulovitěho nebo oválného tvaru. Mohou být citlivé na dotyk a mohou způsobovat brnění. Velmi zřídka se stávají zhoubnými. Na rozdíl od kožních neurofibromů se kůže pohybuje přes podkožní lézi [24-26].



Obrázek 4 Podkožní neurofibrom [26]

1.3.3.3 Plexiformní neurofibromy

Plexiformní neurofibromy (obr. 5) se obvykle projevují při narození, ale mohou se objevit i během dospívání. Vyskytují se přibližně u 30-50 % jedinců s tímto onemocněním. Od kožních neurofibromů se liší tím, že vycházejí z velkých nervových svazků a rostou po celé délce nervu, mohou se rozšířit i do okolních struktur, způsobují bolest a deformaci kostí. Plexiformní neurofibromy představují hrozbu z důvodu transformace na MPNST. Nejlepší léčebnou možností je chirurgické odstranění, ale jejich difúzní infiltrační povaha často brání úplné resekci [9,20-22].

Jedinci s NF1 mají 7-13% riziko vzniku MPNST. MPNST, dříve označován jako neurofibrosarkom, je hlavní příčinou mortality NF1. MPNST je vysoce agresivní a často metastazuje, nejčastěji do plic a kostí. MPNST se objevují nejčastěji v polovině 30. roku života. 5-10 % plexiformních neurofibromů se transformuje na MPNST, nicméně mohou také vznikat *de novo* bez přítomnosti plexiformního neurofibromu. Prognóza MPNST v souvislosti s NF1 je špatná, s přežitím méně než 5 let. Rizikovým faktorem pro vznik MPNST může být mikrolece genu NF1, avšak nedávná studie zjistila, že u pacientů s NF1 s MPNST mohou být různé mutace [6,7,9,22,27].



Obrázek 5 Plexiformní neurofibrom [10]

1.3.3.4 Spinální neurofibromy

Spinální neurofibromy jsou ve většině případů asymptomatické, ale mohou utlačovat míchu a nervové kořeny, což může být spojeno se senzoryckým a motorickým deficitem [20,26].

1.3.4 Gliom optického nervu

Dalším běžným nádorem u NF1 je gliom optiku. Gliom optiku, pilocytický astrocytom 1. stupně, je nádor optického nervu přítomný u 15-20 % pacientů s NF1. Jedná se o pomalu rostoucí nádor, který se může klinicky objevit s proptózou, sníženou zrakovou ostroťí nebo předčasnou pubertou, což svědčí o zásahu do hypotalamu a k útlumu hypothalamo-hypofyzárně-gonadální osy. Avšak zhruba polovina gliomů optiku jsou asymptomatické. Lokalizace gliomů je v oblasti optické dráhy, především v oblasti obou optiků a optického chiasmatu. Gliom optiku se nejčastěji vyskytuje u dětí mladších 6 let. Vzhledem k nízkému věku bývá problematická diagnostika, protože si děti v této věkové kategorii neuvědomují své zhoršení zraku [4,18,20,22].

1.3.5 Lischovy noduly

Lischovy noduly (obr. 6) jsou benigní hamartomy duhovky. Nejprve jsou pozorovány u dětí ve věku 5-10 let, výskyt se zvyšuje s věkem. Nejsou patrné při narození, ale vyskytují se především u pacientů starších (u více než 90 %), udává se ve věku 16 let a více. Nepoškozují zrak, ani nezpůsobují žádné zdravotní potíže, ale jsou nápomocným ukazatelem při diagnostice NF1 [21,28].



Obrázek 6 Lischovy noduly [7]

1.3.6 Kostní dysplazie

Charakteristickým znakem NF1 je dysplazie dlouhých kostí a dysplazie sfenoidálního křídla. Tyto dysplazie jsou detekovány již v raném dětství. Dysplazie dlouhých kostí obvykle nesouvisí s přilehlými neurofibromy na rozdíl od dysplazie sfenoidálního křídla, která s plexiformním neurofibromem souvisí. Dysplazie kosti klínové se projevuje jako očnícová abnormalita. Vrozená dysplazie tibie začíná jako kongenitální prepseudoartróza anterolaterálním zakřivením bérce, která přechází do kongenitálního pakloubu kosti holenní, jehož následkem mohou být postiženy i jiné kosti [7,9,29].

1.4 Další klinické projevy

Neurofibromatóza typu 1 má mnoho klinických projevů. Pro pacienty s NF1 je charakteristický malý vzrůst a makrocefalie vyskytující se u 50-75 % jedinců. Vedle dříve zmíněných diagnostických kritérií jsou lidé s NF1 náchylní k rozvoji dalších onemocnění [4,30].

1.4.1 Kardiovaskulární abnormality

U pacientů s NF1 se mohou vyskytnout různé kardiovaskulární abnormality, od vrozených srdečních chorob po vaskulopatie a hypertenze. Mechanismus vzniku nemoci není plně pochopen, ale pravděpodobně souvisí s nesprávnou funkcí genu NF1, která vede ke zvýšené proliferaci u buněk cévního endotelu. Vaskulopatie zahrnuje stenózu renální a cerebrální arterie, koarktaci aorty a arteriovenózní malformace. Vaskulopatie postihující hlavní tepny, tepny srdce nebo mozku může mít vážné dokonce smrtelné následky. Častým projevem je hypertenze, která se vyskytuje v jakémkoliv věku, u mladších pacientů je také zvýšené riziko mrtvice [9,21,28].

Vaskulopatie je druhou nejčastější příčinou úmrtí. S mortalitou úzce souvisí zvýšený krevní tlak, který by měl být každoročně kontrolován [20].

1.4.2 Kostní abnormality

U pacientů s NF1 se mohou vyvinout kostní abnormality zahrnující osteopenie, skoliózy, dysplázie sfenoidálního křídla, vrozené dysplazie kosti holenní a pseudoartrózy. Až 14 % pacientů je menších vzhledem k věku a mají nízkou hustotu minerálů v kosti. U pacientů starších 40 let je riziko fraktury kosti zvýšené pětinasobně, u dětí mladších 16 let je toto riziko třikrát vyšší. Patogeneze kostních změn není plně pochopena, ale může souviset s nízkou koncentrací vitamínu D, která je zaznamenána u pacientů s NF1, zvýšenou hladinou parathormonu a zvýšenou kostní resorpcí [9,20,21].

Skolióza může postihnout 10-26 % jedinců s NF1. Vzhledem ke zvýšenému procentu výskytu jsou nutná každoroční vyšetření páteře. Skolióza se vyskytuje ve dvou formách – idiopatická a dystrofická forma. Idiopatická forma se podobá idiopatické skolióze, jak v projevech, tak v léčení. Častější je forma dystrofická postihující krátký segment páteře. Závažnější případy vyžadují chirurgický zákrok [21,29].

1.4.3 Nádory

Riziko malignity je u pacientů s NF1 zvýšené, udává se až čtyřikrát. V porovnání s dětmi bez NF1 se u dětí s NF1 často vyskytují myelodysplastické syndromy a juvenilní chronická myeloidní leukémie. Riziko výskytu rakoviny prsu u pacientek s NF1 před 50. rokem života je pětinasobné. Dále se vyskytuje feochromocytom, rhabdomyosarkom, duodenální karcinoid, somatostatinom, gastrointestinální stromální tumor, rakoviny jícnu, žaludku, tlustého střeva, jater, plic, kostí, štítné žlázy a vaječnicků, non-Hodgkinův lymfom a adenom příštítných tělísek. Riziko vzniku nádorů mozku je u pacientů s NF1 zvýšené až pětkrát. Glioblastomy vyskytující se u mladých dospělých mají špatnou prognózu [9,21,22].

U 0,1-5,7 % především dospělých pacientů se objevuje feochromocytom. Ačkoli se v 90 % jedná o benigní nádor, u pacientů s hypertenzí nebo s příznaky nadbytku katecholaminů (bolest hlavy, pocení, palpitace nebo úzkost) je doporučeno sledování z důvodu rizika malignity [20].

Gastrointestinální stromální tumor se objevuje u mladších pacientů s NF1 v porovnání s pacienty bez NF1. Průměrný věk výskytu u pacientů s NF1 je 50 let, bez NF1

60 let. Mezi časté příznaky se řadí bolesti břicha, krvácení, perforace střev a střevní obstrukce [21].

V souvislosti NF1 se objevuje glomus tumor. Nachází se na špičkách prstů, kde reguluje proudění krve a tím i tělesnou teplotu. Léze je pod nehty a způsobuje bolestivost prstu, citlivost na chlad a výraznou palpační citlivost [24].

1.4.4 Neurologické projevy

U 50-80 % jedinců se vyskytují poruchy učení a chování. U dětí s NF1 je pozorovaný zvýšený výskyt poruch pozornosti, hyperaktivity a poruch autistického spektra. Poruchy autistického spektra se vyskytují až u 30 % dětí. U pacientů s NF1 bývá lehká mentální retardace [4,9,20,28].

Zhruba 7 % dětí postihuje sekundární epilepsie následkem expanzivních procesů CNS. Pacienti s NF1 také mají poruchy spánku a velmi časté jsou bolesti hlavy, včetně migrén, které se objevují u 20-25 % dětí s NF1 [4,9].

1.4.5 Autoimunitní onemocnění

Autoimunitní onemocnění vyskytující se ve spojení s NF1 je roztroušená skleróza, systémový lupus erythematoses, membranózní glomerulonefritida, IgA nefropatie, juvenilní artritida, autoimunitní hemolytická anémie a Gravesova–Basedowova nemoc. V současné době existuje málo důkazů, které by prokázaly přímou souvislost s NF1. Předpokládá se, že mutace genu NF1 působí také na buňky imunitního systému a ztrátou funkce genu NF1 lze vysvětlit vznik autoimunitní nemoci u některých citlivých pacientů [31,32].

1.4.6 Poruchy pubertálního vývoje

U 1-4 % dětí s NF1 pozorujeme předčasný nebo naopak opožděný nástup puberty. Předčasnou pubertu pozorujeme u pacientů s gliomem optiku chiasmatu, kdy dochází k tlaku na hypothalamus a k útlumu hypothalamo-hypofyzárně-gonadální osy [4,33].

1.4.7 Psychické problémy

Tyto problémy souvisí se vzhledem a deformací způsobenou neurofibromy, komplexní a nepředvídatelnou povahou onemocnění. Běžně se objevují příznaky úzkosti a deprese a jsou hlášeny případy pokusů o sebevraždu [24].

1.4.8 Těhotenství a antikoncepce

Většina těhotenství probíhající u žen s NF1 jsou bez problémů, ale v některých případech se mohou objevit komplikace. U těhotných s NF1 mohou nastat těhotenské

komplikace zahrnující preeklampsii, špatný růst plodu a předčasné odloučení placenty. Jestliže má žena pánevní nebo genitální neurofibromy, které by mohly komplikovat porod, je nutné provést císařský řez. Těhotné ženy užívající antiepileptika musejí být informovány o možných teratogenních účincích, vitamín K se podává po dobu jednoho měsíce před porodem a kojenci při porodu. Nedávný výzkum ukázal, že 75 % neurofibromů nese progesteronové receptory, nicméně nebylo potvrzeno, že kombinovaná perorální antikoncepce nebo samotná pilulka progesteronu přispívá k růstu neurofibromu [9,24,34].

1.5 Věk při výskytu jednotlivých symptomů

Při narození se vyskytují především kožní projevy nemoci, ale s věkem se četnost vážnějších projevů zvyšuje. Věk při manifestaci nejčastějších klinických projevů shrnuje tab. 1 [9].

Tabulka 1 Věk při výskytu jednotlivých symptomů NF1 [9,33]

Věková skupina	Typický výskyt znaků
Vrozené 0-2 roky	<ul style="list-style-type: none">• CALM (počet se zvyšuje s věkem)• kostní abnormality• plexiformní neurofibromy (zřídka do prvního roku života)
3-6 let	<ul style="list-style-type: none">• axilární a inguinální pihy• optické gliomy• Lischovy noduly
7-11 let	<ul style="list-style-type: none">• poruchy učení• malý vzrůst, makrocefalie• hypertenze• předčasná puberta• migrény• progresivní skolióza
12-17 let	<ul style="list-style-type: none">• kožní neurofibromy• mírnější forma skoliózy
nad 18 let	<ul style="list-style-type: none">• zvýšený počet a velikost neurofibromů• bolesti• MPNST• hypertenze

2 DIAGNOSTIKA

Diagnóza NF1 je stanovena u pacientů na základě diagnostických kritérií NF1. Polovina dětí do 1 roku života mající NF1 s neznámou rodinnou anamnézou NF1 splňují kritéria pro stanovení diagnózy, děti do 8 let s NF1 téměř všechny, jelikož se frekvence diagnostických kritérií zvyšuje s věkem [4,9].

Doplňkem ke stanovení diagnózy je analýza DNA, přímá i nepřímá. Analýza DNA je indikována u pacientů s klinickými projevy NF1, u příbuzných pacientů s potvrzenou mutací v NF1 genu a v rodinách s potvrzenou mutací v NF1 genu je doporučeno prenatální vyšetření. Problémem pro genetickou analýzu je:

- vysoká mutační rychlost
- absence „*hot spots*“ oblastí
- 50 % zárodečných mutací se vyskytuje *de novo*
- velikost genu (velký počet exonů)
- přítomnost pseudogenů NF1 na ostatních chromozomech
- nejasná korelace mezi genotypem a fenotypem

Úspěšnost přímé DNA diagnostiky se udává kolem 70 %. Další možností je diagnostika zaměřená na neurofibromin. Nicméně genetická analýza není zcela spolehlivá, přibližně u 5 % dětí s negativním výsledkem se rozvíjí NF1. Před genetickým testováním je doporučena konzultace s lékařským genetikem [3,4,9,35].

Páry z rodin s potvrzenou mutací v NF1 genu mohou využít genetické poradenství a prenatální diagnostiku. Prenatální diagnostika zahrnuje odběr choriových klků (v 11.-14. týdnu těhotenství) nebo aminocentézu (v 15.-20. týdnu těhotenství). Prenatální ultrazvuková diagnostika neposkytuje informace o NF1. Nutno podotknout, že neexistuje mnoho jasných korelací mezi fenotypem a genotypem a nelze jasně určit průběh NF1, tedy ani charakter postižení plodu [4,28,35].

V závažných případech je možná preimplantační diagnostika. Pacientce jsou odebrána vajíčka, která jsou následně v laboratoři oplodněna spermii. Po několika dnech jsou embrya testována na NF1 [4,35].

Pacienti s NF1 mají 50 % riziko přenosu onemocnění na potomstvo. V případě, že je u dítěte podezření na NF1 je nutná u obou rodičů rodinná anamnéza, oftalmologické vyšetření pomocí šterbinové lampy a lékařská prohlídka zaměřená na klinické projevy NF1.

Diagnostika NF1 u rodičů může umožnit jednoznačnou diagnózu NF1 u dítěte, je důležitá pro genetické poradenství a může mít zdravotní důsledky pro postiženého rodiče. Penetrace genu NF1 je 100 % - u postiženého dítěte se projeví NF1, ale projevy můžou být méně, popřípadě více závažné než u rodiče [24,28].

Při stanovení diagnózy vede podrobný rozhovor lékař vzdělaný v oblasti neurokutánních syndromů, vychází z aktuálních nálezů a jejich závažnosti u konkrétního pacienta. U velké části osob s NF1 jsou zdravotní obtíže, které ale výrazně nesnižují kvalitu života. Pouze u malé části osob dochází k výraznému snížení kvality života – invalidita nebo úmrtí [4].

2.1 Molekulární diagnostika

Molekulární diagnostika NF1 je velmi obtížná. Hlavní problémy jsou zmíněny již dříve. Využívá se jako doplněk ke stanovení diagnózy NF1. Nabývá na významu při rozlišení NF1 od Legiusova syndromu mající velmi podobné klinické projevy (viz diferenciální diagnostika), ale na rozdíl od NF1 je způsobený mutacemi v genu SPRED1, které jsou vzácné. S objevem genu NF1 v roce 1990 byla umožněna i jeho analýza. Správná molekulární diagnostika je užitečná pro potvrzení klinické diagnózy zejména u pacientů se segmentální formou [3,36].

Kolem 85-90 % mutací jsou způsobené substitucí, inzercí nebo delecí jedné báze. Zhruba 2 % tvoří delece nebo duplikace jednoho nebo více exonů a 5-10 % mikrodelece zahrnující NF1 a sousední geny [37].

Pro vyšetření se odebírá nesrážlivá krev, po odběru je izolovaná gDNA nebo mRNA získaná z cDNA. Analýza mRNA může usnadnit molekulární studie, ale problémem je stabilita a tzv. jev *nonsense mediated decay* [1,3].

Jev *nonsense mediated decay* zabraňuje syntéze zkrácených aberantních proteinových produktů obsahujících STOP kodon. V tomto případě se může stát, že při analýze není zjištěna mutace minoritně zastoupené alely [1,3].

Pro detekci více než 95 % patogenních mutací NF1 u jedinců splňujících diagnostická kritéria je nejvhodnější kombinace analýzy gDNA a cDNA (mRNA). Metody založené pouze na analýze gDNA mají nižší citlivost záchytu než metody analyzující cDNA, kvůli různým a vzácným mutacím u postižených jedinců s NF1 a také z toho důvodu, že analýzou gDNA nelze detekovat více než jednu třetinu sestříhových mutací [9,28,38].

Současné protokoly jsou založeny na kombinaci metod, přičemž každá má různý stupeň citlivosti. Odhaduje se, že kombinací lze detekovat mutace až u 95 % pacientů s diagnózou NF1. 5 % případů jsou složitější změny genu NF1, jakými jsou například chromozomální přesmyky. Identifikace minoritních intragenových změn zahrnuje test na zkrácené proteiny (PTT), sekvenování cDNA, analýzu jednořetězcového konformačního polymorfismu (SSCP), denaturační gradientovou gelovou elektroforézu (DGGE), gelovou elektroforézu s teplotním gradientem (TGGE) a denaturační vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (dHPLC). K analýze celého genu nebo změn v počtu intragenových kopií je využívána fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), Southern blotting, komparativní genomová hybridizace (CGH) a multiplexová ligačně dependentní amplifikace prób (MLPA) [3,37].

K analýze mutací lze využít DNA diagnostiku, přímou i nepřímou, a také metody molekulární cytogenetiky [3,4].

Přímá DNA diagnostika umožňuje zachytit a identifikovat konkrétní mutaci, která vede ke vzniku onemocnění. Nejprve se zjišťuje mutace u postiženého, a to tak, že v úsecích s nálezem nejvíce mutací začíná testování a v případě neúspěchu se pokračuje postupným vyšetřením dalších úseků, což může být zdlouhavé obzvláště u genu NF1, který se řadí mezi jedny z největších genů v lidském genomu. Ostatní členové rodiny jsou vyšetřeni na tuto konkrétní mutaci, čímž se analýza značně urychlí [39].

Nepřímou DNA diagnostiku lze aplikovat na pacientech, u kterých nebyla přesně identifikovaná mutace genu NF1. Principem je vazebná analýza markeru a mutovaného genu. Markery, přenášené z rodičů na potomky, jsou lokalizovány v těsném sousedství nebo uvnitř sledovaného genu a využívá se polymorfismů DNA. K této diagnostice jsou potřeba vzorky DNA od více členů rodiny jak zdravých, tak minimálně dvou postižených. Problémem této diagnostiky je potřeba velkého množství vzorků od příbuzných [39].

Molekulární cytogenetika se využívá za předpokladu, že klinická diagnóza NF1 je jasná, ale analýzou cDNA a gDNA nebyla nalezena žádná patogenní varianta. U méně než 1 % postižených jedinců jsou za NF1 zodpovědné cytogenetické přesmyky. Patogenní změny vyskytující se v těchto případech mohou být detekovány vícestupňovou analýzou cDNA [9].

2.1.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) se využívá především k amplifikaci vyšetřovaného úseku genu. Krátký úsek DNA je ohraničen pomocí oligonukleotidových primerů, které se váží na templátovou DNA. Termostabilní DNA polymeráza nasedá na primery a syntetizuje nový řetězec komplementární k původnímu řetězci. Při PCR je využíván termocykler zajišťující střídání teplot, tím je umožněno také střídání tří kroků – denaturace DNA, připojení primerů a elongace [1,39].

Modifikací PCR je *real-time* PCR umožňující monitorovat a zaznamenat množství DNA v reálném čase na základě změn fluorescence. Detekce je umožněna použitím fluorescenčních barviv, která se vážou na dsDNA nebo fluorescenčně značených sond, dále termocykleru obsahujícím nejen zdroj indukující fluorescenci, ale také fotosenzitivní čidlo. V případě, že *real-time* PCR je hodnocena kvantitativně, pak se jedná o *real-time* qPCR [1].

Většina screeningových metod (PTT, SSCP, DGGE, TGGE, dHPLC) je založena na PCR, za účelem získání dostatečného množství specifického úseku DNA. Pro potvrzení delecí se aplikuje *real-time* PCR, což bylo využito ve studii vyšetřující 63 pacientů a ve 23 případech se jednalo o delece jednoho/více exonů, popřípadě delece celého genu analyzované metodou MLPA. Po testování MLPA byly pozitivní vzorky podrobeny znovu analýze a potvrzeny pomocí metody *real-time* PCR [8].

2.1.2 Test na zkrácené proteiny

PTT byl využíván v minulosti a umožňuje identifikaci mutací, které vedou k syntéze zkráceného proteinu. Reverzní transkripcí a PCR je získaná cDNA z mRNA. Poté následuje transkripce a translace *in vitro*. Velikost zkráceného proteinu je zjištěna elektroforeticky [3,39].

Tato metoda je však pracná, vyžaduje příslušné laboratorní vybavení a nejedná se ani o metodu dostatečně přesnou. Nelze detekovat mutace měnící smysl, malé inserce/delece, které nevedou ke změně čtecího rámce. Od této metody se postupně upouštělo a byla nahrazována sekvenováním [3,39].

2.1.3 Sekvenování

Sekvenování řadíme mezi analytické metody, díky kterým lze odhalit odchylky v nukleotidové sekvenci DNA. V posledních letech došlo k zautomatizování těchto metod a staly se jedny z nejvíce využívaných. Dle velikosti genu můžeme metody sekvenování

využít buď k odhalení mutací nebo k sekvenování určitého úseku s mutací, které jsou zjištěny jinými metodami. Sekvenování na úrovni cDNA může zvýšit citlivost detekce mutací [38,39].

Pro Sangerovu metodu využíváme templát, DNA polymerázu, primer, deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP) a dideoxynukleotidfosfáty neobsahující OH skupinu na rozdíl od dNTP a zabraňující dalšímu prodlužování řetězce. Využívá se fluorescenční značení dideoxynukleotidfosfátu nebo jej můžeme značit radioaktivně. DNA polymeráza syntetizuje pouze z jedné strany nový řetězec, díky ní vznikají DNA fragmenty. Výsledkem jsou řetězce komplementární k sekvenci templátu a navzájem jsou o jeden nukleotid kratší. Následně jsou fragmenty DNA separovány gelovou nebo kapilární elektroforézou, během které je snímána fluorescence ve čtyřech barevných kanálech. Software následně vyhodnocuje řazení jednotlivých bází v řetězci a porovnává s referenční sekvencí. Sangerovou metodou lze detekovat mutace měnící smysl, inserce, delece, polymorfismy, nesmyslné mutace [1,38,39].

Hlavním principem sekvenování nové generace (NGS) je masivně paralelní sekvenování, kdy v jednom okamžiku je sekvenováno velké množství molekul. Fragmentací cDNA jsou získány krátké úseky, které mohou být následně amplifikovány s použitím PCR. Nejčastějším principem pro určování bází DNA je tzv. sekvenování syntézou, kde DNA polymeráza postupně syntetizuje vlákno komplementární k jednovláknovému templátu sekvenovaného fragmentu. Použitím chemických sloučenin, po začlenění nové báze do řetězce DNA, dojde k uvolnění signálu – nejčastěji světlo, které je zachyceno. NGS představuje ohromné zlepšení pro screening mutací v NF1 genu srovnatelné se Sangerovou metodou, přičemž je nákladově výhodnější a rychlejší. Jelikož se jedná o metodu rychlou, lze sekvenování nové generace využít při diagnostice velkých genů, kterým NF1 gen je [1,40].

Sekvenování gDNA pomocí Sangerovy metody nebo NGS má nevýhodu a tou je dlouhý proces v porovnání se sekvenováním cDNA. 21 % mutací NF1 genu jsou mutace sestříhové, které v případě obou metod nelze přímo identifikovat. Přímé sekvenování se využívá především k potvrzení a charakterizaci mutací zjištěných použitím jiných metod [3,8].

2.1.4 Jednořetězcový konformační polymorfismus

SSCP je elektroforetická metoda k analýze jednovláknové DNA. Jednovláknová DNA má tendenci tvořit trojrozměrnou strukturu stabilizovanou slabými intramolekulárními silami. Úsek DNA je namnožen pomocí PCR, denaturován a nanesen na gel. Pohyblivost trojrozměrných struktur v polyakrylamidovém gelu závisí nejen na délce řetězce, ale také

zároveň na jeho struktuře. Mutace způsobí odlišnou konformaci a dojde k odlišné pohyblivosti v porovnání s kontrolními vzorky [38,39].

SSCP je metodou jednoduchou, ale na rozdíl od DGGE méně citlivou, což je způsobeno malým rozdílem ve struktuře, která neovlivní mobilitu vlákna v gelu [39].

2.1.5 Elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu

Během chybného párování bází vznikají heteroduplexy, které se vytvoří spojením komplementárních vláken DNA, každé jiného původu – mutované a nemutované vlákno. Metoda DGGE je založena na analýze heteroduplexů. Homoduplexy a heteroduplexy migrují při elektroforéze polyakrylamidovým gelem s postupně se zvyšující koncentrací denaturujících látek. Používanými denaturačními činidly jsou močovina a formamid. Stabilita heteroduplexů je menší, vlákna se separují dříve a jejich pohyblivost se zpomalí [38,39,41].

DGGE je metodou citlivou pro detekci malých mutací, míra detekce se přibližuje 99 %. Tato metoda byla použita k analýze mutací v genu NF1 v exonech 29 a 31 a mutace byly identifikovány u 4 ze 70 nepříbuzných pacientů s NF1 [42].

2.1.6 Gelová elektroforéza s teplotním gradientem

Gelová elektroforéza s teplotním gradientem je obdobou DGGE s tím rozdílem, že místo zvyšující se koncentrace denaturujících látek, se postupně zvyšuje teplota [41].

Obecně platí, že se zvyšující se teplotou se zvyšuje i elektroforetická mobilita, ale ke změně mobility bude docházet především v důsledku změny struktury makromolekul. TGGE je metoda vhodná zejména pro nukleové kyseliny, protože teplota tání dvoušroubovice je dobře prostudována. Se zvyšující teplotou je dvoušroubovice částečně rozpojena, je spojena pouze na jednom nebo obou koncích zbytkové dvoušroubovice a mobilita se snižuje. Při vysokých teplotách dochází k úplnému rozpletení [41].

Analýzou TGGE byly detekovány mutace v exonu 4b, 5, 8, 10c, 12b, 19a, 20, 22, 25, 31 a 37 genu NF1 [42].

2.1.7 Denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie

Stejně jako předchozí, tato metoda je založena na analýze heteroduplexů, jejichž pohyblivost je rozdílná v porovnání s homoduplexy. Mobilita je pozorována na chromatografické koloně [38].

Celková míra záchytu mutací s využitím této metody, uvedená ve studii z roku 2003, činila 72 %. Tehdy se jednalo o nejcitlivější metodu pro analýzu NF1 genu. Mezi neidentifikované mutace patřily velké delece zahrnující celý gen NF1 nebo jeho hlavní části, dále velké duplikace a inverze [43].

V České republice proběhla studie vyšetřující 22 nezávislých pacientů kombinací metod dHPLC, MLPA a přímého sekvenování. Citlivost detekce mutací dHPLC činila 75 %, což je hodnota srovnatelná s předchozími studiemi [44].

2.1.8 Fluorescenční *in situ* hybridizace

FISH je molekulární cytogenetická technika sloužící k mapování sekvence DNA na chromozomech. K této metodě je využívána fluorescenčně značená sonda komplementární k vyšetřovanému vlákně. Nejprve dochází k denuraci a vzniku jednovláknové DNA. Následným spojením podle zásad komplementarity značené DNA a vyšetřované DNA vzniká dvouvláknová hybridní DNA, která je po odmytí nenavázané sondy a obarvení pomocí barviva DAPI, pozorována pod fluorescenčním mikroskopem [1,45,46].

FISH používá tři základní typy sond, kterými jsou LSI, CEP nebo WCP. Lokusově specifické sondy (LSI) se váží na vybraný lokus na chromozomu. LSI sondy se používají ke stanovení počtu kopií genu nebo jednotlivých oblastí chromozomu. Dalšími sondami jsou sondy telomerické nebo centromerické (CEP). Centromerické sondy se využívají ke stanovení počtu kopií chromozomu a telomerické k detekci aberací telomerických sekvencí. Poslední základní sondou je malovací sonda (celochromozomová, WCP), která hybridizuje na celý chromozom a využívá se k detekci chromozomových přestaveb [1].

Existuje metoda přímá a nepřímá. Nepřímá metoda využívá sondy značené biotinem nebo digoxigeninem s následnou detekcí za použití fluorescenčně značené protilátky. U přímé metody jsou sondy značené fluoroforem a signál je pozorován ihned. Jedná se o metodu vysoce specifickou a citlivou [1,46].

FISH metoda se využívá k detekci rozsáhlých delecí zahrnujících celý gen NF1. Touto metodou, na rozdíl od MLPA, nelze detekovat delecii jednoho exonu [3].

2.1.9 Komparativní genomová hybridizace

CGH umožňuje detekci změn počtu kopií DNA v genomu. Při CGH využívající metafázové chromozomy je vyšetřovaná DNA značená rozdílným fluoroforem než referenční DNA. U pacienta bez změny počtu kopií DNA hybridizuje stejné množství značené

vyšetřované a referenční DNA s metafázovými chromozomy. Výsledkem je poměr intenzity fluorescence vyšetřované a referenční DNA, která se měří podél délky chromozomů pomocí digitální analýzy obrazu. V případě amplifikace dojde ke zvýšení poměru intenzity fluorescence, naopak tomu bude u delecí, kdy je poměr snížen [46].

Array CGH využívá namísto metafázových chromozomů takzvané čipy. Čipy jsou speciálně připravená skla, kde každý fragment klonované genomové DNA má přesně definované místo. Fluoroforem označená vyšetřovaná a referenční DNA hybridizuje s čipem. Výsledkem je rovněž poměr intenzity fluorescence hodnocen speciálním přístrojem se softwarem. V porovnání s CGH je tato metoda přesnější, má vyšší rozlišení a rozsah změn [47].

Metodou array CGH lze charakterizovat a rozlišit mikrolece. Ve studii, potvrzující tento fakt, bylo charakterizováno celkem 70 mikrolecí a rozlišeno do 4 skupin. Typ 1 (77 %), typ 2 (9 %), typ 3 (4 %) a atypické mikrolece (10 %) [48].

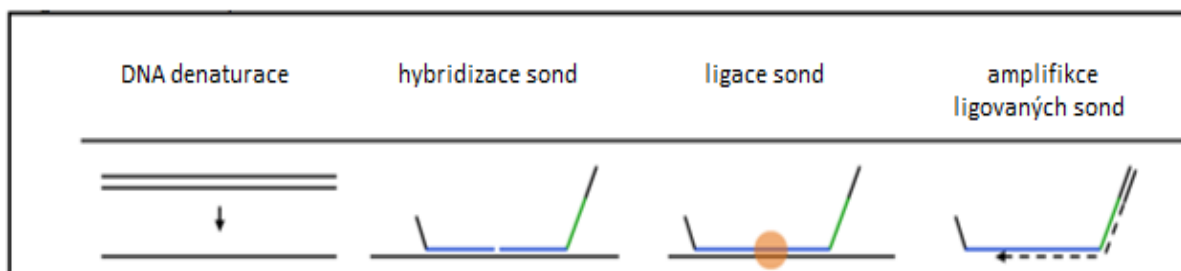
2.1.10 Southern blotting

Principem této metody je přenos jednořetězcové molekuly, která vznikla rozštěpením DNA restriktivními enzymy a rozdělením elektroforézou, z gelu na nylonovou membránu. K hybridizaci je využívána sonda značena radioaktivně, díky tomu je zviditelněna komplementární sekvence DNA. Přítomnost mutací lze odvodit z rozdílné mobility kontrolní DNA a vzorku [38].

2.1.11 Multiplexová ligačně dependentní amplifikace prób

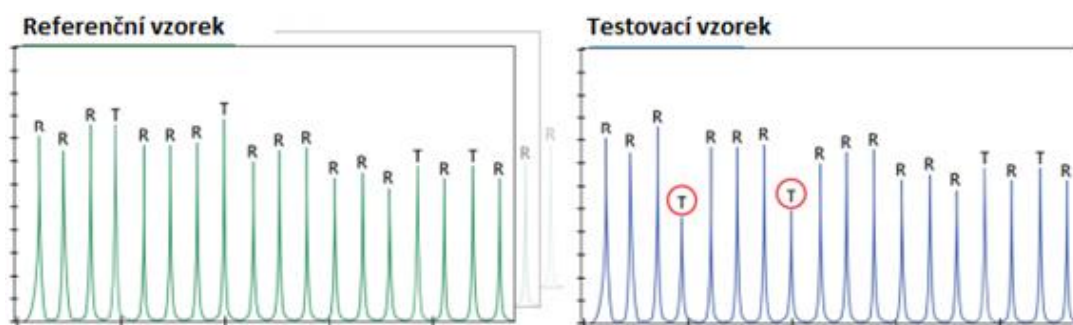
Metoda MLPA (obr. 7), představená v roce 2004, je v současnosti jedna z nejpoužívanějších metod pro analýzu NF1 genu. Velkou výhodou této metody je detekce delece jednoho exonu, což není možné ani pomocí FISH metody [3].

Jedná se o mnohonásobnou PCR metodu, která umožňuje identifikovat abnormální počet kopií a sekvenci, která se odlišuje pouze jedním nukleotidem. Pro použití je potřeba termocykler a kapilární elektroforéza. MLPA metodu lze rozdělit do 5 kroků: denaturace DNA a hybridizace sond MLPA, ligační a následná PCR reakce, separace amplifikačních produktů elektroforézou a na závěr analýza dat [49].



Obrázek 7 Metoda MLPA. Převzato a upraveno z [50].

Po denaturaci DNA se ke vzorku přidává směs sond MLPA, která se skládá ze dvou oligonukleotidů hybridizujících k přilehlým cílovým sekvencím. Následně jsou spojeny ligací. V dalším kroku PCR reakcí dochází k amplifikaci pouze ligovaných sond, tím pádem počet produktů těchto ligovaných sond odpovídá cílovým sekvencím ve vzorku. Následně dochází k separaci kapilární elektroforézou a výsledkem je elektroforeogram (obr. 8). Z elektroforeogramu jsou odečítány výšky píků, které jsou porovnávány s výškami píků referenčního vzorku. Delece jedné nebo více cílových sekvencí se projeví snížením výšky píku, naopak zvýšení počtu kopií je zaznamenáno zvýšením píku [50].



Obrázek 8 Elektroforeogram. Převzato a upraveno z [50].

Elektroforeogram testovacího vzorku (napravo) je porovnáván s elektroforeogramem referenčního vzorku (nalevo). Červeně zakroužkováná oblast poukazuje na pokles dvou sond v testovacím vzorku.

Studie probíhající v letech 2008-2013 na Slovensku testovala 107 nezávislých pacientů. K testování NF1 genu byla použito sekvenování cDNA k odhalení sestřihových mutací a také MLPA analýza k identifikaci rozsáhlých delecí. Mimoto MLPA metoda byla využita k ověření intragenových delecí nalezených sekvenováním a k identifikaci mutací nenalezených sekvenováním. U 88 % pacientů byla mutace potvrzená přímým sekvenováním. Jednalo se nejčastěji o posunové mutace (43 %), sestřihové mutace (17 %), nesmyslné mutace (13 %), mutace měnící smysl (12 %) a *in frame* delece (3 %). Zbývajících 10 pacientů bylo testováno metodou MLPA. U 5 pacientů byly nalezeny intragenové mutace (6 %), u dalších

5 delece celého genu (6 %). Kombinace analýzy cDNA a MLPA metody je tedy účinná k analýze NF1 genu [51].

Ve studii proběhlé v České republice, která byla již zmíněna u metody dHPLC, byla metoda MLPA využita k detekci rozsáhlých duplikací a inverzí a následně byly potvrzeny dvě genomové přestavby [44].

Kombinací metod dHPLC a MLPA byla identifikována mutace, ve studii z roku 2011, u 53 pacientů z 56 (95 %), což prokazuje vysokou citlivost a byl zaveden protokol pro rutinní testování mutací NF1 genu [37].

2.2 Diferenciální diagnostika

Existuje více než 100 dědičných onemocnění a syndromů, které mají podobné projevy jako neurofibromatóza typu 1 a častokrát bývají s NF1 zaměňovány. V ojedinělých případech může osoba bez NF1 splňovat diagnostická kritéria NF1, ale v tomto případě může být NF1 vyloučena z důvodu přítomnosti jiných charakteristických projevů [28].

2.2.1 CALM s rodinným výskytem

Skvrny CALM se mohou vyskytnout jako izolovaný rodový znak, ale v případě, že velikost přesahuje 5 mm je velká pravděpodobnost neurofibromatózy typu 1 [33].

2.2.2 Neurofibromatóza typu 2

NF2 je vzácnější onemocnění než NF1, vyskytuje se u 1 z 25 000 narozených dětí. Charakteristický je výskyt oboustranných vestibulárních schwannomů, které se objevují v období dospívání a projevují se ztrátou sluchu, bolestí hlavy, poruchou rovnováhy a chůze. Z diagnostických kritérií pro NF1 se zřídka mohou objevovat CALM a neurofibromy, naopak nevyskytují se Lischovy noduly, axilární a inguinální pihy. U pacientů s NF2 je výrazně vyšší riziko vzniku tumorů CNS oproti NF1 [27,33].

2.2.3 Legiusův syndrom

Legiusův syndrom se projevuje změnami barvy kůže. Téměř všichni pacienti s tímto onemocněním mají CALM, mohou se vyskytovat axilární a inguinální pihy. Dalším symptomem je makrocefalie, někteří pacienti trpí poruchami učení a pozornosti. Mnoho příznaků je totožných s NF1 a odlišení bývá velmi problematické, zvláště u malých dětí. U tohoto syndromu se neobjevují Lischovy noduly, neurofibromy, ani nádory CNS [28,52].

2.2.4 Proteův syndrom

Proteův syndrom je charakterizován hemihypertrofií, vznikem řady nádorů (lipomů, lymfangiony), makrocefalií, plicními komplikacemi a jedinci s tímto onemocněním mají predispozici k hluboké žilní trombóze a plicní embolii [33,53].

2.2.5 McCuneův-Albrightův syndrom

McCuneův-Albrightův syndrom je charakterizován polyostotickou fibrózní dysplázií a předčasnou pubertou. Z diagnostických kritérií pro NF1 je shodný výskyt CALM, ale naopak se nevyskytují neurofibromy, axilární a inguinální pihy a Lischovy noduly [33,54].

2.2.6 Noonanův syndrom

Noonanův syndrom je autosomálně dominantní porucha. U tohoto syndromu je charakteristický výskyt vrozených srdečních vad, malého vzrůstu, širokého krku a typického obličejového dysmorfismu [28,55].

2.2.7 Watsonův syndrom

Watsonův syndrom je způsobený mutací genu NF1. Jedná se o podtyp NF1 s jednotným fenotypem v rodinách. Projevuje se plicní stenózou, kognitivními poruchami, CALM a mohou se vyskytovat kožní neurofibromy [24].

2.2.8 Mozaiková forma

Existuje mozaiková forma NF1, způsobená koexistencí geneticky odlišných buněčných linií v jednom organismu. Prevalence mozaikové formy NF1 je 0,0006-0,0027 %, ačkoli je pravděpodobně nedostatečně hlášena. Jednotlivci s mozaikovou formou NF1 mají mírnější fenotyp, méně klinických projevů a komplikací než klasická forma NF1, což může vést k nedokonalému rozpoznání. Riziko přenosu na potomstvo je výrazně nižší, odhaduje se na 5 %, v porovnání s klasickou NF1. Mozaicismus v případě NF1 je způsobený v průběhu embryonálního vývoje a v závislosti na době výskytu mutace může vést ke generalizovanému, segmentálnímu nebo gonadálnímu mozaicismu. Mutace objevující se v počáteční fázi embryonálního vývoje způsobily generalizovaný mozaicismus, který svými projevy připomíná klasickou NF1 s méně závažným průběhem. Poměrně vzácnou formou je gonadální mozaicismus, který je pozorován u zdravých rodičů mající dvě a více dětí postižených NF1. Naopak mutace vznikající v pozdějším stádiu prenatalního vývoje mají za následek segmentální NF1 [3,26,56].

Prevalence segmentální formy NF1 je 0,0014-0,002 %, jedná se tedy o vzácnou poruchu, ale v posledních letech je zaznamenán nárůst hlášených případů, který souvisí s větším zájmem o tuto variantu syndromu. Segmentální forma se projevuje klinickými příznaky omezenými na jednu část těla. Klinicky lze rozdělit pacienty do 4 skupin – pouze s pigmentovými změnami, pouze s neurofibromy, s pigmentovými změnami a neurofibromy a s izolovanými plexiformními neurofibromy. Mnohdy bývá klinický obraz pacienta se segmentální formou NF1 bez povšimnutí z důvodu nepřítomnosti příznaků [3,57].

3 LÉČBA

Léčba NF1 je symptomatická a v současné době neexistuje terapie, která by zabránila vzniku NF1 nebo zhoršení onemocnění [4,33].

3.1 Monitorování pacienta

U pacientů s NF1 je důležité sledování z důvodu rozvoje onkologických, neurologických, ortopedických, psychiatrických, speciálně pedagogických a dalších komplikací této diagnózy. Jedinci s NF1 by měli být obezřetní a v případě komplikací a neobvyklých příznaků vyhledat lékaře, zda problémy nesouvisí s tímto onemocněním. Děti s NF1 by měly absolvovat každý rok komplexní vyšetření, které shrnuje tab. 2. Pravidelné kontroly u starších pacientů záleží na jejich uvážení a závažnosti onemocnění [4,24,35].

Tabulka 2 Hodnocení dítěte s NF1 [24]

Při každoroční návštěvě se zaznamenává
<ul style="list-style-type: none">rozvoj a pokrok ve škole
<ul style="list-style-type: none">vizuální projevy, zraková ostrost, fundoskopie až do věku 7 let (gliom optické dráhy, glaukom)
<ul style="list-style-type: none">obvod hlavy (rychlý nárůst může naznačit nádor nebo hydrocefalus)
<ul style="list-style-type: none">výška
<ul style="list-style-type: none">hmotnost
<ul style="list-style-type: none">puberta – předčasná/opožděná
<ul style="list-style-type: none">krevní tlak (stenóza renální arterie, feochromocytom)
<ul style="list-style-type: none">kardiovaskulární vyšetření (vrozená srdeční choroba, především plicní stenóza)
<ul style="list-style-type: none">zhodnocení páteře (skolióza, plexiformní neurofibrom)
<ul style="list-style-type: none">zhodnocení kůže (kožní, podkožní, plexiformní neurofibrom)
<ul style="list-style-type: none">kontrola ostatních příznaků

Zaznamenává se výška, hmotnost, obvod hlavy. U každého pacienta, bez ohledu na věk, by měl být vyšetřen tlak. Oftalmologické vyšetření je důležité především u dětí, méně často se provádí u starších dětí a dospělých. Pacienti s kardiovaskulárními, CNS, PNS, kosterními abnormalitami a abnormalitami zahrnujícími endokrinní systém by se měli léčit u příslušných odborníků. U většiny pacientů s NF1 nejsou žádná omezení fyzické aktivity, s výjimkou pacientů s kostními abnormalitami (tibiální dysplázie, dysplastická skolióza) [9,28].

3.2 Léčba klinických projevů

Lischovy noduly, CALM, axilární a inguinální pihy obvykle nezpůsobují žádné komplikace a nevyžadují léčbu. V některých případech CALM i pihy mohou způsobit estetické problémy, což může snížit kvalitu života. V těchto případech je možné využít laserovou léčbu. Nutno podotknout, že může docházet k opětovnému růstu CALM nebo pih [20,24,58].

Kožní nebo subkutánní neurofibromy, především na nevhodných místech, jsou odstraněny chirurgicky. Malé neurofibromy lze odstranit laserem, elektrokoagulací nebo tekutým dusíkem, avšak dochází k opětovnému růstu na samém místě nebo v blízkosti. Pro rychlé a účinné odstranění se využívá laser [9,28,33].

Pro monitorování velikosti a rozsahu plexiformních neurofibromů se využívá MRI metoda. Plexiformní neurofibromy mohou způsobit znetvoření, nadměrný růst, popřípadě mohou narušit normální struktury. Chirurgická léčba je poměrně náročná kvůli těsnému spojení s nervy [9,28,33].

Zvětšení a bolest plexiformního neurofibromu může signalizovat transformaci na MPNST. Vyšetřování pomocí MRI a pozitronové emisní tomografie je užitečné při rozlišení benigních a maligních nádorů MPNST. Konečné potvrzení, zda se jedná o maligní či benigní nádor, vyžaduje histologické vyšetření nádoru. Nejúčinnější léčebnou metodou je chirurgická excize, méně účinná je radioterapie nebo adjuvantní chemoterapie. Chirurgická léčba by měla být provedena co nejdříve, z důvodu vysokého rizika metastáz [9,28,33].

Projevy gliomu optického nervu jsou většinou asymptomatické, zhruba ve 35-52 % případech je vyžadována léčba. Otázkou zůstává načasování a vhodnost léčby gliomu optického nervu. Diskutuje se, zda zahájit léčbu v případě nepřítomnosti změn ve vidění. Progrese gliomu optického nervu je definována za přítomnosti 1 nebo více parametrů, kterými jsou snížená zraková ostrost, snížené barevné vidění, progrese defektu zorného pole, progrese proptózy, nástup endokrinní dysfunkce a neurologických poruch. Gliom optického nervu se léčí chemoterapeuticky nebo chirurgicky. Dříve byla chemoterapie indikována především u malých dětí, u starších byla doporučována radioterapie, avšak nyní se od tohoto schématu upouští a chemoterapie je doporučována u všech pacientů, bez ohledu na věk. Radioterapie se nedoporučuje z důvodu zvýšeného rizika sekundárních nádorů, onemocnění moyamoya, kognitivních, endokrinních nebo neurovaskulárních komplikací. Při standardní chemoterapii

se podává kombinace cytostatik vinkristinu a karboplatiny. Cílem chemoterapie je zastavení růstu nádoru a stabilizace, popřípadě zlepšení vidění. Výsledky vlivu chemoterapie na vidění se hodně liší, v některých případech výsledky neodpovídají MRI a hlavním cílem dalších studií je určit biomarkery nebo markery MRI. Chirurgická léčba je indikována u pacientů s jednostranným optickým gliomem, který způsobuje proptózu a slepotu [26,59].

Glioblastomy, jejichž riziko vzniku u pacientů s NF1 je zvýšené, se léčí chirurgickou resekcí a následnou adjuvantní radioterapií a chemoterapií, kdy se podává temozolomid [21].

Epilepsie u pacientů s NF1 je léčena stejně jako epilepsie u běžné populace s rozdílem užívání levetiracetamu, který není doporučován u pacientů s NF1 a poruchou kognitivních funkcí z důvodu možnosti zhoršení chování a u pacientů s NF1 zvýšeného rizika vzniku osteoporózy [26].

Další komplikací NF1 jsou kostní abnormality. Léčba skoliózy závisí na formě. Nondystrofická forma skoliózy je léčena stejně jako idiopatická skolióza u celé populace, jedna z léčebných možností je využití korzetu nebo cvičení. V některých případech nevyžaduje léčbu. Dystrofická skolióza vyžaduje chirurgický zákrok, který je obtížný. V případě chirurgické léčby tibiální pseudoartrózy je výsledek často neuspokojivý. U pacientů s osteoporózou s NF1 se využívá léčba bisfosfonáty, i když účinek je menší než u pacientů bez NF1 [9,35].

Mezi další projevy NF1 patří kognitivní a behaviorální poruchy. Pro léčbu poruch pozornosti s hyperaktivitou u pacientů s NF1 byl testován metylfenidát, u kterého byl dokázán pozitivní účinek. Došlo ke zlepšení příznaků a také u pacientů léčených metylfenidátem se zlepšilo IQ. Patogeneze kognitivních poruch není plně pochopena. Na myších modelech byl testován lovastatin, specifický inhibitor 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductázy, jedná se o enzym, který omezuje rychlost biosyntézy cholesterolu. Navzdory očekávání, kdy u myši došlo k vyvrácení deficitu pozornosti a učení, neměl lovastatin významný vliv na zlepšení učení nebo pozornosti u dětí s NF1 [24,60].

3.3 Cílená léčba

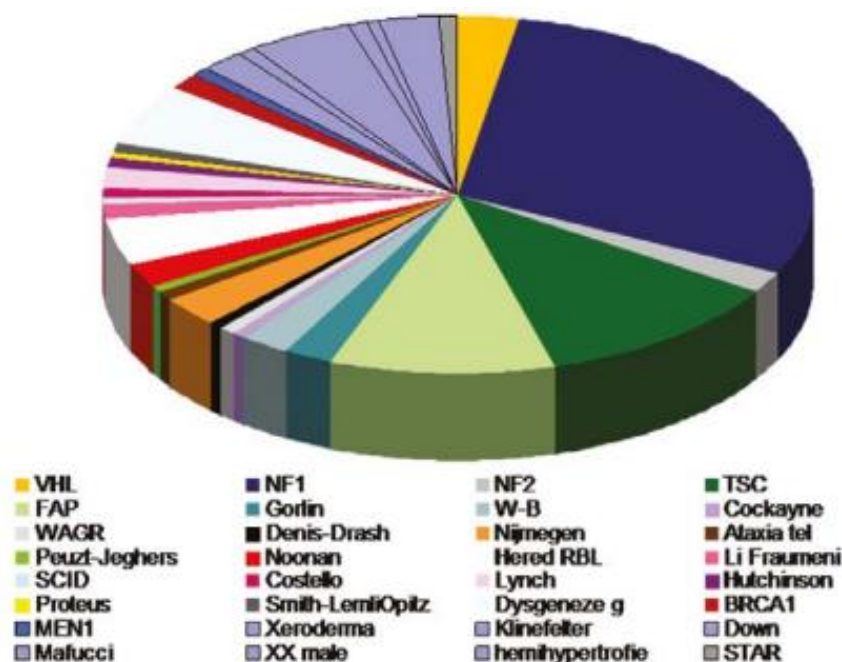
V souvislosti s pokroky pochopení NF1 na molekulární a buněčné úrovni jsou studována nová léčiva v klinických studiích. Ve studiích jsou potenciální léčebné přípravky testovány na geneticky modifikovaných myších modelech. Jeden z těchto léčebných přípravků je imatinib, inhibitor receptorů s tyrozinkinázovou aktivitou. Použitím imatinibu došlo ke snížení růstu plexiformního neurofibromu o více než 20 % u 17 % léčených

pacientů. Kombinací radioterapie s inhibítozem mTOR a bortezumibem (inhibitor proteosomu) došlo ke snížené proliferaci *in vitro*, snížení růstu nádorů a zvýšené apoptóze *in vivo*. Další léčebnou možností, zejména gliomu optického nervu, je léčba monoklonální protilátkou proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru – bevacizumabem. V současnosti je testován účinek MEK inhibitoru, který snížil velikost neurofibromu a u většiny myších modelů s implantovanými lidskými buňkami MPNST zvýšil přežití. MEK inhibitor, který inhibuje MAPK dráhu, je momentálně testován ve 2 klinických studiích na pacientech s NF1 a s plexiformními neurofibromy [61,62].

4 PREVALENCE A VÝSKYT

Onemocnění NF1 postihuje přibližně 1 z 2500 až 3500 narozených dětí, a to bez ohledu na rasu, pohlaví nebo etnickou skupinu. Jedná se o jednu z nejrozšířenějších genetických poruch na celém světě, výskyt NF1 je častější než cystické fibrózy, Huntingovy nebo Tay-Sachsova choroby [7,13].

NF1 se řadí mezi nejčastější geneticky predispoziční syndromy s rizikem vzniku nádoru v dětském věku. Od roku 2009 Klinika dětské onkologie FN Brno dispenzarizuje děti s nádorovými predispozičními syndromy. K roku 2015 sleduje celkem 44 dětí s NF1 (28 %, obr. 9) a průměrným věkem 1-14 let. Dispenzarizace dědičných nádorových syndromů má rostoucí charakter, problémem zůstává nedostatečné rozpoznání predispozičního syndromu a v případě rozpoznání bývá pacient léčen u jiného specialisty [63,64].



Obrázek 9 Zastoupení jednotlivých syndromů predisponujících k nádorům u pacientů KDO FN Brno [64]

Jak bylo zmíněno již dříve, NF1 je autosomálně dominantní onemocnění, přičemž pouze v 50 % případů se jedná o dědičnost, kdy onemocnění se vyskytuje v rodině. Zbýlých 50 % je důsledkem sporadických genových mutací (výsledek *de novo* mutací). V posledních letech je trendem, především ve vyspělých zemích, vyšší věk rodičů při narození dítěte a s tím úzce souvisí zvýšené riziko vzniku genetických onemocnění. Studie probíhající v období 1976 až 2005 posoudila vliv vyššího věku rodičů při narození dítěte, zejména otců, na výskyt sporadických mutací NF1 genu v České republice. Studie se zaměřila především na věk otců

z toho důvodu, že více než 80 % intragenových mutací NF1 genu jsou otcovského původu. Výsledkem bylo zjištění, že věk otce má vliv na výskyt sporadických mutací NF1 genu. Sporadické případy NF1 v této studii se vyskytovaly ve 35,6 % případech [65].

Mezi pracoviště poskytující analýzu genu NF1 v České republice řadíme Ústav biologie a lékařské genetiky a FN Motol v Praze a Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Brno [4].

Průměrná délka života pacientů s NF1 je snížena o 15 let. Nejčastější příčinou předčasného úmrtí jsou MPNST a vaskulopatie [28].

ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na charakteristiku onemocnění neurofibromatózy typu 1. Jedná se o progresivní onemocnění, jehož příznaky se většinou zvyšují s věkem. Pacientům s NF1 je doporučováno komplexní vyšetření každý rok z důvodu zvýšeného rizika vzniku nádorů a rozvoje dalších komplikací této diagnózy.

Diagnóza NF1 je založená na základě klinického obrazu a doplňkem je molekulární diagnostika, která je poměrně obtížná. Problémem pro genetickou analýzu je vysoká mutační rychlost, 50 % zárodečných mutací se vyskytuje *de novo*, velikost genu, přítomnost pseudogenů NF1 na ostatních chromozomech, absence „*hot spots*“ oblastí a také nejasná korelace mezi genotypem a fenotypem. Kombinací metod se dá dosáhnout až 95 % účinnosti. V současné době je nejpoužívanější metodou pro analýzu NF1 genu metoda MLPA.

Léčba je symptomatická, tedy zaměřená pouze na příznaky a prozatím neexistuje terapie, která by zabránila vzniku NF1 nebo zhoršení onemocnění. Výzvou do dalších let je cílená léčba, která díky pochopení patogeneze tohoto onemocnění působí cíleně na buněčné a molekulární pochody vedoucí ke vzniku klinických projevů NF1.

Vzhledem k tomu, že fenotypová variabilita je výrazná, dokonce i v rámci rodiny, nelze jednoznačně určit další vývoj onemocnění u konkrétního pacienta. Prognóza závisí na přítomnosti specifického příznaku. U většiny pacientů jsou mírné až středně závažné projevy, přesto v nejzávažnějších případech může dojít ke snížení délky života až o 15 let a důvodem jsou nejčastěji zhoubné nádory a vaskulopatie. Včasná diagnostika a léčba může zlepšit kvalitu života a snížit úmrtnost.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] FORETOVÁ, L., SVOBODA, M. a SLABÝ, O. Molekulární genetik v onkologii. Praha: Mladá fronta – Medical Services, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3236-0.
- [2] Nádorová onemocnění. Státní zdravotní ústav [online]. [cit. 2018-06-15]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni>
- [3] ABRAMOWICZ, A. a GOS, M. Neurofibromin in neurofibromatosis type 1- mutations in NF1 gene as a cause of disease. *Developmental Period Medicine*. 2014, 18(3), s. 297-306 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <http://devperiodmed.pl/articles/2014-3-2.pdf>
- [4] PETRÁK, B., PLEVOVÁ, P., NOVOTNÝ, J. a FORETOVÁ, L. Neurofibromatosis von Recklinghausen. *Klin Onkol* [online]. 2009, 22(Suppl 1), s. 38-44 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/149/3461.pdf>
- [5] WEGSCHEID, M. L., ANASTASAKI, C. a GUTMANN, D. H. Human stem cell modeling in neurofibromatosis type 1 (NF1). *Experimental Neurology* [online]. 2018, 299, s. 270-280 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.04.001. ISSN 00144886. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488617300948>
- [6] YAP, Y-S., MCPHERSON, J. R., ONG, CH.-K., ROZEN, S. G., TEH, B.-T, LEE, A. S. G. a CALLEN, D. F. The NF1 gene revisited – from bench to bedside. *Oncotarget* [online]. 2014, 5(15), s. 5873-5892 [cit. 2018-04-02]. DOI: 10.18632/oncotarget.2194. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/fulltext/2194>
- [7] ANDERSON, J. L. a GUTMANN, D. H. Neurofibromatosis type 1. *Neurocutaneous Syndromes* [online]. Elsevier, 2015, 132, s. 75-86 [cit. 2018-04-02]. *Handbook of Clinical Neurology*. DOI: 10.1016/B978-0-444-62702-5.00004-4. ISBN 9780444627025. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444627025000044?via%3Dihub>
- [8] DE LUCA, A., BOTTILLO, I., DASDIA, M. C., et al. Deletions of NF1 gene and exons detected by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Journal of Medical Genetics* [online]. 2007, 44(12), s. 800-808 [cit. 2018-06-11]. DOI: 10.1136/jmg.2007.053785. ISSN 1468-6244. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2652822/>
- [9] FREIDMAN, J. M. Neurofibromatosis 1. ADAM, M. P., ARDINGER, H. H. a PAGON, R. A., et al. *GeneReviews®* [Internet] [online]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2018 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1109/>

- [10] PARICHEHR, G., SABERI, Z. a SARDARI, F. Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease): A family case report and literature review. *Dental Research Journal* [online]. 2012, 9(4), s. 483–488 [cit. 2018-04-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491339/>
- [11] PHILPOTT, CH., TOVELL, H., FRAYLING, I. M., COOPER, D. N. a UPADHYAYA, M. The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Human Genomics* [online]. 2017, 11(1) [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1186/s40246-017-0109-3. ISSN 1479-7364. Dostupné z: <http://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-017-0109-3>
- [12] EVANS, D. G., BOWERS, N., BURKITT-WRIGHT, E., et al. Comprehensive RNA Analysis of the NF1 Gene in Classically Affected NF1 Affected Individuals Meeting NIH Criteria has High Sensitivity and Mutation Negative Testing is Reassuring in Isolated Cases With Pigmentary Features Only. *EBioMedicine* [online]. 2016, 7, s. 212-220 [cit. 2018-06-07]. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.04.005. ISSN 23523964. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396416301402>
- [13] PIERSALL, L. a GUTMANN, D. H. Neurofibromatosis 1. *Neurobiology of Disease* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 413-423 [cit. 2018-06-11]. DOI: 10.1016/B978-012088592-3/50039-6. ISBN 9780120885923. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120885923500396>
- [14] NF1 gene. *Genetics Home Reference* [online]. [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NF1#sourcesforpage>
- [15] FAHSOLD, R., HOFFMEYER, S., MISCHUNG, C., et al. Minor Lesion Mutational Spectrum of the Entire NF1 Gene Does Not Explain Its High Mutability but Points to a Functional Domain Upstream of the GAP-Related Domain. *The American Journal of Human Genetics* [online]. 2000, 66(3), s. 790-818 [cit. 2018-04-22]. DOI: 10.1086/302809. ISSN 00029297. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707640099>
- [16] WELTI, S., D'ANGELO, I. a SCHEFFZEK, K. Structure and Function of Neurofibromin. KAUFMANN, D., ed. *Neurofibromatoses*. Basel: KARGER, 2008, 2008, s. 113-128. Monographs in Human Genetics. ISBN 978-3-8055-8520-0.
- [17] TROVÓ-MARQUI, A. B. a TAJARA, E. H. Neurofibromin: a general outlook. *Clinical Genetics*. 2006, 70(1), s. 1-13. ISSN 00099163.

- [18] BOYD, K. P., KORF, B. R. a THEOS, A. Neurofibromatosis type 1. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. 2009, 61(1), s. 1-14 [cit. 2018-04-12]. DOI: 10.1016/j.jaad.2008.12.051. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2716546/#R1>
- [19] KORF, B. R. Neurofibromatosis. *Pediatric Neurology Part I* [online]. Elsevier, 2013, 111, s. 333-340 [cit. 2018-04-12]. *Handbook of Clinical Neurology*. DOI: 10.1016/B978-0-444-52891-9.00039-7. ISBN 9780444528919. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444528919000397>
- [20] WILLIAMS, V. C., LUCAS, J., BABCOCK, M. A., GUTMANN, D. H., KORF, B. a MARIA, B. L. Neurofibromatosis Type 1 Revisited. *PEDIATRICS*. 2009, 123(1), s. 124-133. ISSN 0031-4005.
- [21] HIRBE, A. C. a GUTMANN, D. H. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *The Lancet Neurology* [online]. 2014, 13(8), s. 834-843 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70063-8. ISSN 14744422. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(14\)70063-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(14)70063-8/fulltext)
- [22] KIURU, M. a BUSAM, K. J. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory Investigation* [online]. 2017, 97(2), s. 146-157 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1038/labinvest.2016.142. ISSN 0023-6837. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/labinvest2016142>
- [23] MUNTAU, A. *Pediatric*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2525-3
- [24] FERNER, R. E, HUSON, S. M., THOMAS, N., et al. Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. *Journal of Medical Genetics* [online]. 2006, 44(2), s. 81-88 [cit. 2018-05-14]. DOI: 10.1136/jmg.2006.045906. ISSN 1468-6244. Dostupné z: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2006.045906>
- [25] KHOSROTEHRANI, K., BASTUJI-GARIN, S., RICCARDI, V. M., BIRCH, P., FRIEDMAN, J. M. a WOLKENSTEIN, P. Subcutaneous neurofibromas are associated with mortality in neurofibromatosis 1: A cohort study of 703 patients. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2005, 132A(1), s. 49-53. ISSN 15524825.
- [26] FERNER, R. E. a GUTMANN, D. H. Neurofibromatosis type 1 (NF1). *Peripheral Nerve Disorders* [online]. Elsevier, 2013, 115, s. 939-955 [cit. 2018-05-17]. *Handbook of Clinical*

Neurology. DOI: 10.1016/B978-0-444-52902-2.00053-9. ISBN 9780444529022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444529022000539>

[27] FERNER, R. E. Neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2: a twenty first century perspective. *The Lancet Neurology* [online]. 2007, 6(4), s. 340-351 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1016/S1474-4422(07)70075-3. ISSN 14744422. Dostupné z: [https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422\(07\)70075-3/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laneur/article/PIIS1474-4422(07)70075-3/fulltext)

[28] JETT, K. a FRIEDMAN, J. M. Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. *Genetics in Medicine* [online]. 2009, 12(1), s. 1-11 [cit. 2018-04-17]. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181bf15e3. ISSN 1098-3600. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1097/GIM.0b013e3181bf15e3>

[29] DUNGL, P. *Ortopedie. 2., preprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4357-8.*

[30] MORRIS, S. M., MONROE, C. L. a GUTMANN, D. H. Macrocephaly Is Not a Predictor of Optic Pathway Glioma Development or Treatment in Neurofibromatosis Type 1. *Journal of Child Neurology*. 2016, 31(14), s. 1540-1545. ISSN 0883-0738.

[31] OZHAN, B., OZGUVEN, A. A. a ERSOY, B. Neurofibromatosis Type 1 and Diabetes Mellitus: An Unusual Association. *Case Reports in Endocrinology* [online]. 2013, 2013, s. 1-3 [cit. 2018-04-28]. DOI: 10.1155/2013/689107. ISSN 2090-6501. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/crie/2013/689107/>

[32] NANDA, A. Autoimmune Diseases Associated with Neurofibromatosis Type 1. *Pediatric Dermatology*. 2008, 25(3), s. 392-393. ISSN 0736-8046.

[33] HLAVATÁ, A., RYBÁROVÁ, A., KOŠŤÁLOVÁ, L., et al. Dlhodobé komplexné sledovanie detí s neurofibromatózou v detskom veku. *Pediatrica pre prax* [online]. 2009, 10(2), s. 75-80 [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: http://pediatriapreprax.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=3683&magazine_id=4

[34] LEPPÄVIRTA, J., KALLIONPÄÄ, R. A., UUSITALO, E., VAHLBERG, T., PÖYHÖNEN, M., TIMONEN, S., PELTONEN, J. a PELTONEN, S. The pregnancy in neurofibromatosis 1: A retrospective register-based total population study. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2017, 173(10), s. 2641-2648. ISSN 15524825.

- [35] Neurofibromatosis type 1. NHS Choices [online]. [cit. 2018-05-13]. Dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/neurofibromatosis-type-1/diagnosis/>
- [36] PASMANT, E. a VIDAUD, D. Neurofibromatosis Type 1 Molecular Diagnosis: The RNA Point of View. *EBioMedicine* [online]. 2016, 7, s. 21-22 [cit. 2018-05-16]. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.04.036. ISSN 23523964. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396416301785>
- [37] CARMEN VALERO, M., MARTÍN, Y., HERNÁNDEZ-IMAZ, E., et al. A Highly Sensitive Genetic Protocol to Detect NF1 Mutations. *The Journal of Molecular Diagnostics* [online]. 2011, 13(2), s. 113-122 [cit. 2018-05-31]. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2010.09.002. ISSN 15251578. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3128626/>
- [38] DVOŘÁKOVÁ, L., HŘEBÍČEK, M. a ELLEDER, M. Molekulárně genetická diagnostika v klinické medicíně. *Postgraduální medicína* [online]. 2002, 2002(5) [cit. 2018-05-16]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/molekularne-geneticka-diagnostika-v-klinicke-medicine-146700>
- [39] OTOVÁ, B. a KOHOUTOVÁ, M. *Lékařská biologie a genetika. 2., nezměněné vydání.* Praha: Karolinum, 2014. ISBN 9788024637907.
- [40] KREJČÍ, A., MÜLLER, P. a VOJTĚŠEK, B. Bioinformatics and Next-generation Sequencing. *Klinická onkologie* [online]. 2015, 28(Suppl 2), s. 91-96 [cit. 2018-05-31]. DOI: 10.14735/amko20152S91. ISSN 0862495X. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4764/>
- [41] Electrophoresis. CREIGHTON, T. E. *The Physical and Chemical Basis of Molecular Biology.* Helvetian Press, 2010, s. 495-498. ISBN 9780956478108.
- [42] TOLIAT, M. R., ERDOGAN, F., GEWIES, A., FAHSOLD, R., BUSKE, A., TINSCHERT, S. a NÜRNBERG, P. Analysis of the NF1 gene by temperature gradient gel electrophoresis reveals a high incidence of mutations in exon 4b. *Electrophoresis*. 2000, 21(3), s. 541-544.
- [43] LUC, A. D., BUCCINO, A., GIANNI, D., et al. NF1 gene analysis based on DHPLC. *Human Mutation*. 2003, 21(2), s. 171-172. ISSN 1059-7794.
- [44] BENDOVA, S., KREPELOVA, A., PETRAK, B., KINSTOVA, L., MUSOVA, Z. a MARIKOVA, T. Novel Mutations in the NF1 Gene in Czech Patients With

Neurofibromatosis Type 1. *Journal of Molecular Neuroscience*. Humana Press, 2007, 2007(31), s. 273-279.

[45] STANYON, R. Fluorescence in situ Hybridization. BEZANSON, M., MACKINNON, K. C., RILEY, E., et al., ed. *The International Encyclopedia of Primatology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2016, 2017-04-16, s. 1-2. ISBN 9781119179313.

[46] TSUCHIYA, K. D. Fluorescence In Situ Hybridization. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2011, 31(4), s. 525-542. ISSN 02722712.

[47] JAROŠOVÁ, M., POSPÍŠILOVÁ H., PLACHÝ R., PAPAJÍK T., KOPTÍKOVÁ J. a INDRÁK K. Určování nebalancovaných genových změn metodou array komparativní genomové hybridizace (array CGH) u nádorů. *Klinická onkologie* [online]. 2006, 19(Suppl 2), s. 342-346 [cit. 2018-06-04]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2006-12-30-supplement2/urcovani-nebalancovanych-genovych-zmen-metodou-array-komparativni-genomove-hybri/>

[48] PASMANT, E., SABBAGH, A., SPURLOCK, G., et al. NF1 microdeletions in neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype. *Human Mutation* [online]. 2010, 31(6), s. 1506-1516 [cit. 2018-06-10]. DOI: 10.1002/humu.21271. ISSN 10597794. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/humu.21271>

[49] MRC-Holland: MLPA [online]. [cit. 2018-06-03]. Dostupné z: https://mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=_hS-AvFINWhkPMYt9ZIZdCx7-VkDGgJqQ1uzZmJTgWTQ.

[50] MLPA® General Protocol: Instructions For Use. In: MRC-Holland: MLPA [online]. 23. 3. 2018 [cit. 2018-06-13]. Dostupné z: http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?Tag=_G1U3PYAOzf2SFuaxkiqa4YjruAIwx3T3q8uAJJ_V-Ws.

[51] NÉMETHOVÁ, M., BOLČEKOVÁ, A., POŽGAYOVÁ, S., ILENČÍKOVÁ, D., HLAVATÁ, A., KÁDAŠI, R., KOVÁČZ, L. a ZAŤKOVÁ, A. Molekulárna diagnostika NF1 na Slovensku s využitím analýzy cDNA a MLPA. *Cesk Slov Neurol* [online]. 2014, 2014(6), s. 721-733 [cit. 2018-06-10]. Dostupné z: http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/molekularna-diagnostika-nf1-na-slovensku-s-vyuzitim-analyzy-cdna-a-mlpa-50236?confirm_rules=1

- [52] Legius syndrome [online]. [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/legius-syndrome>
- [53] BIESECKER, L. G. a SAPP, J. C. Proteus Syndrom. ADAM, M. P., ARDINGER, H. H. a PAGON, R. A. GeneReviews® [online]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2018 [cit. 2018-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK99495/>
- [54] HOU, J. W. McCune–Albright Syndrome: Diagnosis and clinical course in eleven patients. *Pediatrics & Neonatology* [online]. 2017 [cit. 2018-04-27]. DOI: 10.1016/j.pedneo.2017.11.005. ISSN 18759572. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875957217302711>
- [55] TURNER, A. M. Noonan syndrome. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2014, 50(10), s. 14-20. ISSN 10344810.
- [56] GARCÍA-ROMERO, M. T., PARKIN, P. a LARA-CORRALES, I. Mosaic Neurofibromatosis Type 1: A Systematic Review. *Pediatric Dermatology*. 2016, 33(1), s. 9-17. ISSN 07368046.
- [57] GABHANE, S. K., KOTWAL, M. N. a BOBHATE, S. K. Segmental neurofibromatosis: A report of 3 cases. *Indian Journal of Dermatology* [online]. 2010, 55(1), s. 105-108 [cit. 2018-06-07]. DOI: 10.4103/0019-5154.60366. ISSN 0019-5154. Dostupné z: <http://www.e-ijd.org/text.asp?2010/55/1/105/60366>
- [58] SABATINI, C., MILANI, D., MENNI, F., TADINI, G. a ESPOSITO, S. Treatment of Neurofibromatosis Type 1. *Current Treatment Options in Neurology*. 2015, 17(6). ISSN 1092-8480.
- [59] KINORI, M., HODGSON, N. a ZEID, J. L. Ophthalmic manifestations in neurofibromatosis type 1. *Survey of Ophthalmology* [online]. 2017, 63(4), s. 518-533 [cit. 2018-05-28]. DOI: 10.1016/j.survophthal.2017.10.007. ISSN 00396257. Dostupné z: [https://www.surveyophthalmol.com/article/S0039-6257\(17\)30126-1/fulltext](https://www.surveyophthalmol.com/article/S0039-6257(17)30126-1/fulltext)
- [60] TORRES NUPAN, M. M., VELEZ VAN MEERBEKE, A., LÓPEZ CABRA, C. A. a HERRERA GOMEZ, P. M. Cognitive and Behavioral Disorders in Children with Neurofibromatosis Type 1. *Frontiers in Pediatrics* [online]. 2017, 5 [cit. 2018-05-28]. DOI: 10.3389/fped.2017.00227. ISSN 2296-2360. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5670111/>

- [61] KARAJANNIS, M. A. a FERNER, R. E. Neurofibromatosis-related tumors. *Current Opinion in Pediatrics* [online]. 2015, 27(1), s. 26-33 [cit. 2018-05-28]. DOI: 10.1097/MOP.000000000000169. ISSN 1040-8703. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4374132/>
- [62] LIN, A. L. a GUTMANN, D. H. Advances in the treatment of neurofibromatosis-associated tumours. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2013, 10(11), s. 616-624. ISSN 1759-4774.
- [63] BAJČIOVÁ, V. Syndromes Predisposing to Cancer in Children – the Experience of Pediatric Oncology Department of University Hospital Brno. *Klinicka onkologie* [online]. 2016, 29(Suppl 1), s. 62-S70 [cit. 2018-06-11]. DOI: 10.14735/amko2016S62. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/409/4882.pdf>
- [64] BAJČIOVÁ, V. K nádorům predisponující syndromy v dětském věku – role pediatra primárního kontaktu. *Pediatric pro praxi* [online]. 2015, 16(5), s. 300-304 [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2015/05/03.pdf>
- [65] SNAJDEROVA, M., RICCARDI, M. V., PETRAK, B., et al. The importance of advanced parental age in the origin of neurofibromatosis type 1. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2012, 158A(3), s. 519-523. ISSN 15524825.