



Charakterystyka biochemiczna zaburzeń neurometabolicznych

dr n.med. Katarzyna Kuśmierska
Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej
Instytut Matki i Dziecka

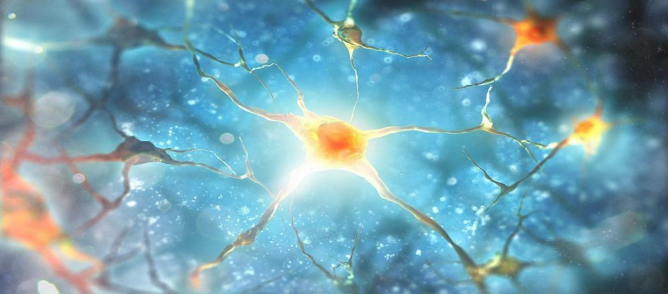


Choroby neurometaboliczne

Dotyczą dużej grupy przemian metabolicznych wpływających na OUN, które nie zostały jeszcze w pełni określone.

zaburzenia spowodowane są przez mutacje w genach, które kontrolują pośrednio metabolizm:

- węglowodanów
 - lipidów
- aminokwasów
- witamin
- energetyczny



Choroby neurometaboliczne

Kumulacja lub brak wybranych związków dostarcza użytecznych biomarkerów do diagnostyki i różnicowania tych rzadkich chorób.

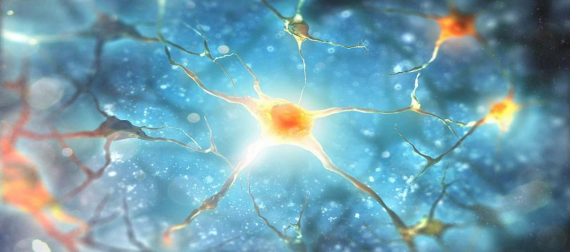
Do neurometabolicznych zaburzeń można zaliczyć drgawki lub encefalopatię padaczkową pojawiające się już w okresie noworodkowym.

Drgawki mogą być częścią większej, złożonej prezentacji neurologicznej, rzadko „cechą choroby”.



Wrodzone błędy metabolizmu u pacjentów z drgawkami w okresie noworodkowym i niemowlęcym

nieketotyczna hiperglicynemia (NKH)
kofaktor Molibdenowy (MOCOD) i izolowany deficyt oksydazy siarczynowej
defekty cyklu mocznikowego (UCD)
choroba syropu klonowego (MSUD)
acydurie organiczne (OA)
padaczka pirydoksyno-zależna (PDE)
drgawki pirydoksalo-5-fosforano-zależne (PNPO def)
deficyt transportera glukozy (Glut -1)
deficyt seryny
zaburzenia mitochondrialne
Deficyt syntetazy holokarboksylowej
Defekt kreatyny (GAMT)



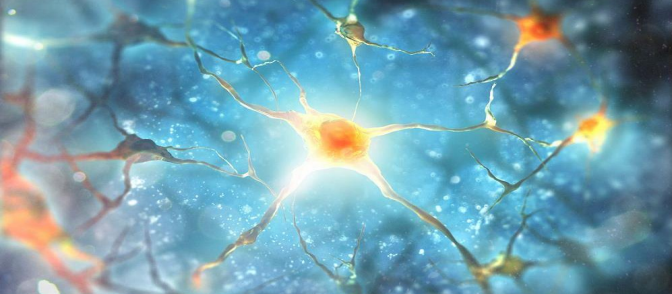
Choroby neurometaboliczne

- niedojrzałość układu hamującego podczas wczesnego rozwoju mózgu i jego rozregulowanie w wyniku dysfunkcji metabolicznej obniżają próg drgawkowy u noworodków;
- wyjaśnia to silna ekspresja jonotropowych receptorów glutaminianowych i ekspresja podjednostki receptora ułatwiającego zwiększony napływ jonów wapnia;
- aktywacja receptorów GABA może być pobudzająca w niedojrzałym mózgu,
- istnieją znaczne dowody na to, że zmiany w „sygnalizacji” GABA mogą powodować drgawki i że drgawki mogą zmieniać „sygnalizację” GABA.



Choroby neurometaboliczne – powiązane z metabolizmem metioniny

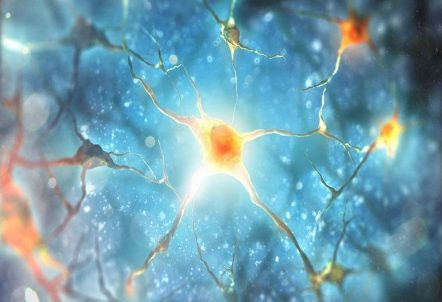
- Kwas foliowy – transport grup metylowych w cyklu metioninowym
- Fosforan pirydoksalu – katalizator enzymu CBS oraz przemian w procesach transmetylacji i syntezy związków neuroprotekcyjnych, DNA, czy neuroprzekaźników,
- Siarczyn – związek zdolny do wiązania fosforanu pirydoksalu
- Glutaminian – jeden z najważniejszych aminokwasów, strukturalnie podobny do S-sulfocysteiny, która jest zdolna do wiązania receptorów NMDA i jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za rozwój drgawek i uszkodzenie mózgu w deficycie kofaktora molibdenowego i SO.
- Tauryna – związek neuroprotekcyjny dla glutaminianu i GABA



Choroby neurometaboliczne

W niektórych IEM nadmierne gromadzenie się związków może powodować bezpośrednią neurotoksyczność, a niektóre czynniki wyzwalające, takie jak gorączka lub katabolizm, mogą poprzedzać początek napadu i/lub encefalopatii padaczkowej.

Pierwotne lub wtórne zaburzenia na szlaku metabolizmu neurotransmiterów z nadmiernym pobudzeniem lub brakiem zahamowania w niedojrzałym mózgu może również zwiększyć aktywność napadów.



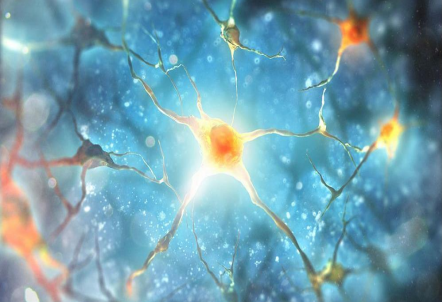
Neurotransmisja

ciąg procesów umożliwiających przekazanie sygnału z jednej komórki do drugiej.

U człowieka podstawową rolę w przekazywaniu pobudzenia pomiędzy komórkami nerwowymi odgrywają synapsy chemiczne.

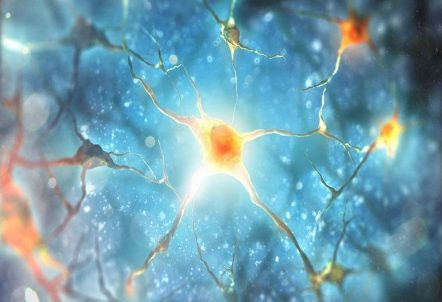
Transmisja sygnału między synapsami chemicznymi obejmuje uwalnianie z komórki presynaptycznej cząsteczek (neuroprzekaźnika lub neuromodulatora), które wiążą się z receptorami na błonie postsynaptycznej komórki docelowej,

Neurotransmisja chemiczna nie ogranicza się do synaps ośrodkowego układu nerwowego, ale występuje także w tkankach obwodowych, w tym w połączeniach nerwowo-mięśniowych



Komórki nerwowe

- Są zdolne do odbierania, przetwarzania i przechowywania informacji
- integrują zdolność przekazywania informacji poprzez sieć, uwzględniając takie mechanizmy jak pamięć, uczenie się i świadomość
- neurony są spolaryzowane strukturalnie i funkcjonalnie. Jest to widoczne w ich trójstronnym różnicowaniu strukturalnym komórki: ciała komórki (somy), aksonu i dendrytów.



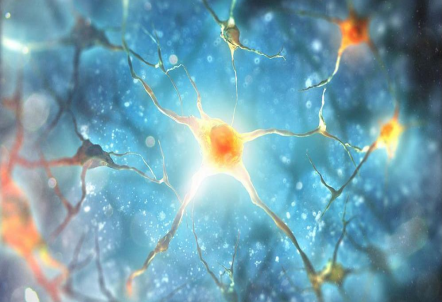
Neurotransmitery

wiele różnych białek receptorowych i transporterów – przypisanych jest do jednego neuroprzekaźnika

różnorodność białek receptorowych odzwierciedla na poziomie molekularnym, funkcjonalną różnorodność sieci neuronowych.

Substancja neuroaktywna musi spełniać określone kryteria, aby mogła zostać sklasyfikowana jako neuroprzekaźnik:

- a/ musi być pochodzenia neuronalnego i gromadzić się w zakończeniach presynaptycznych, gdzie jest uwalniana po depolaryzacji
- b/ musi aktywować receptory w zakończeniach postsynaptycznych
- c/ musi być metabolicznie inaktywowana lub usuwana przez mechanizmy wychwytu zwrotnego



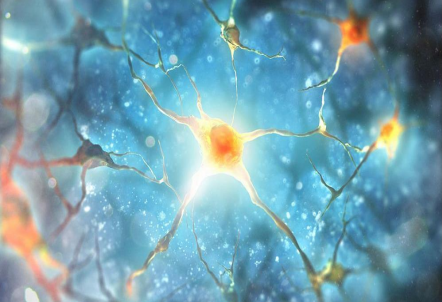
Neuromodulatory

W przeciwieństwie do neuroprzekaźników, neuromodulatory można podzielić na kilka podklas. Największa podklasa składa się z neuropeptydów.

Historia odkrycia neuropeptydów sięga lat 60. i 70. XX wieku, kiedy stało się jasne, że czynnikami regulującymi przysadkę mózgową są substancje peptyderygiczne oraz że niektóre peptydy jelitowe są syntetyzowane w ośrodkowym układzie nerwowym.

Neuropeptydy są syntetyzowane przez neurony i uwalniane z zakończenia presynaptycznego, jak ma to miejsce w przypadku neuroprzekaźników. Podobnie jak neuroprzekaźniki, niektóre neuropeptydy działają w zakończeniach postsynaptycznych, ale ponieważ nie spełniają wszystkich innych kryteriów dla neurotransmiterów, nie są tak klasyfikowane.

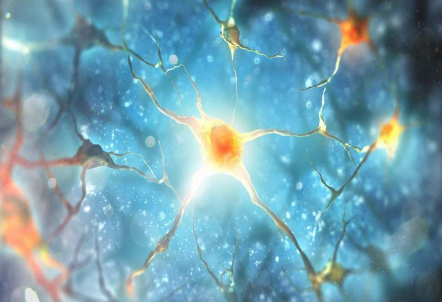
Neuropeptydy są często nazywane „domniemanymi neuroprzekaźnikami” (na przykład: endorfiny).



Metody wykorzystywane w rozpoznawaniu zaburzeń neurotransmisji

1. HPLC z detektorem elektrochemicznym:

- wykorzystuje potencjał elektryczny w procesie utleniania-redukcji za pomocą odpowiednich elektrod;
- powstały prąd jest mierzony w funkcji czasu. Detekcja elektrochemiczna jest stosowana tam, gdzie wymagana jest wysoka czułość lub selektywność.
- detekcja elektrochemiczna może być stosowana tylko w przypadku cząsteczek elektrochemicznie aktywnych
- cząsteczki nieaktywne elektrochemicznie muszą zostać przekształcone w cząsteczki aktywne, na przykład poprzez reakcję enzymatyczną



Metody wykorzystywane w rozpoznawaniu zaburzeń neurotransmisji

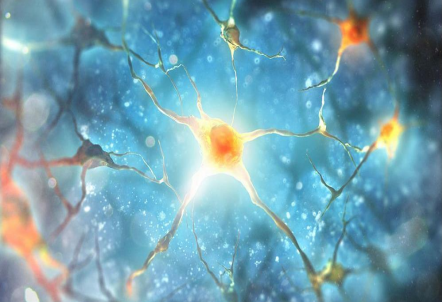
- Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) stała się potężnym narzędziem w neurochemii analitycznej i preparatywnej. Nowoczesne metody HPLC można wykorzystać do kilku celów, w tym do rozdzielania, oczyszczania i oceny ilościowej związków neurochemicznych.
- spektrometria masowa z jonizacją typu elektrosprej (ESI-MS / MS), umożliwia identyfikację zarówno małych jak i dużych cząsteczek, w tym białek z wysoko złożonych mieszanin z dużą dokładnością

Neurotransmitery (NTs)



Związki drobnocząsteczkowe:

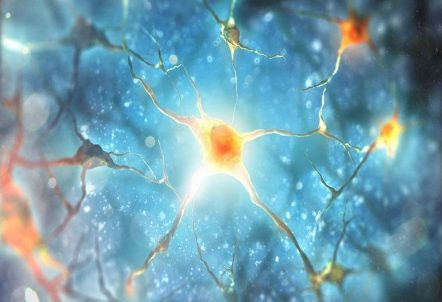
- acetylocholina
- kwas γ -aminomasłowy (GABA),
- glicyna
- glutaminian
- katecholaminy monoaminowe
- serotonina



Neurotransmitery

Wszystkie neuroprzekaźniki, z wyjątkiem histaminy, są wychwytywane przez wysoce specyficzne systemy transportowe. Transportery odgrywają znaczącą rolę w szybkiej inaktywacji uwolnionego neuroprzekaźnika, ograniczając jego czasowe i przestrzenne działanie.





Aminy biogenne

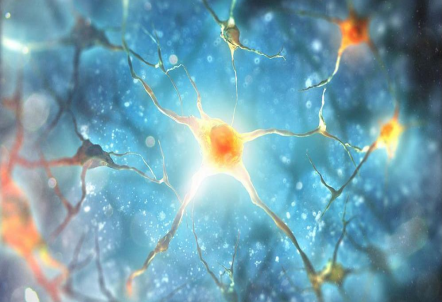
Pierwsza udana synteza dopaminy (3,4-dihydroksyfenetyloaminy lub 3-hydroksytryptaminy) - 1910 r

neurony dopaminergiczne zostały odkryte przez Bell (1989) w nerwach obwodowych

Dopamina pełni istotną funkcję w procesach neuroregulacyjnych

Istotną różnicą biochemiczną między neuronami noradrenergicznymi a neuronami dopaminergicznymi jest obecność enzymu beta-hydroksylazy dopaminowej.

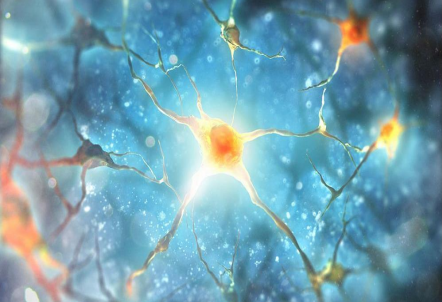
W neuronach dopaminergicznych beta-hydroksylaza dopaminowa katalizuje syntezę noradrenaliny z dopaminy



Dopamina

Z klinicznego punktu widzenia dopamina cieszyła się dużym zainteresowaniem, ponieważ bierze ona udział w poważnych chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, parkinsonizm czy schizofrenia.

Dopamina, podobnie jak inne neuroprzekaźniki, nie jest w stanie przekroczyć bariery krew-mózg. Jednak prekursory dopaminy, fenyloalanina i tyrozyna (tyrozyna może być syntetyzowana z fenyloalaniny przez aktywność hydroksylazy fenyloalenowej) są w stanie tą barierę pokonać.



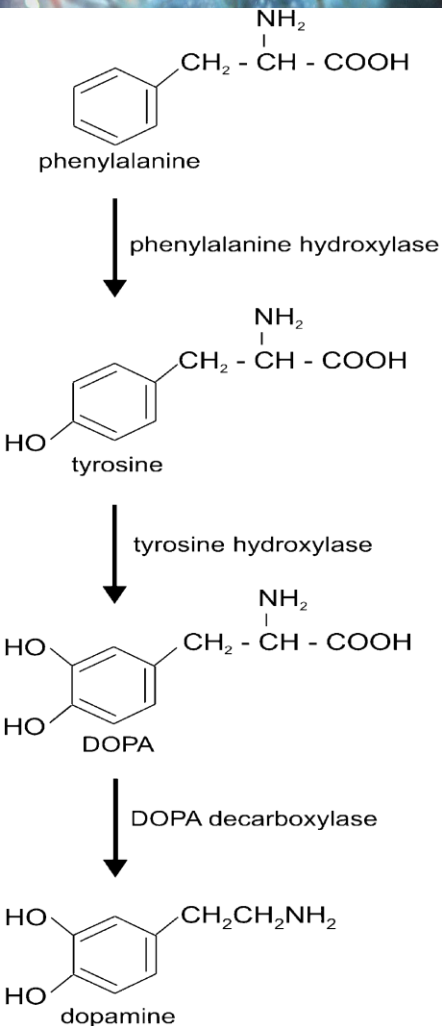
Synteza Dopaminy

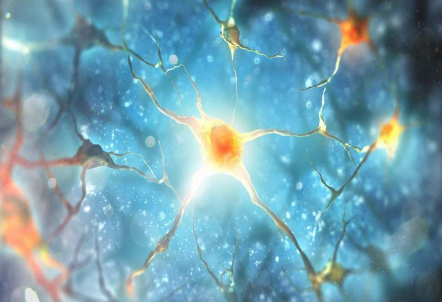
Hydroksylaza tyrozyny - enzym odpowiedzialny za syntezę L-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA); decyduje o szybkości syntezy dopaminy, jest obecna we wszystkich neuronach zawierających dopaminę.

TH jest oksydazą, która wymaga tetrahydrobiopteryny i tlenu jako kofaktorów;

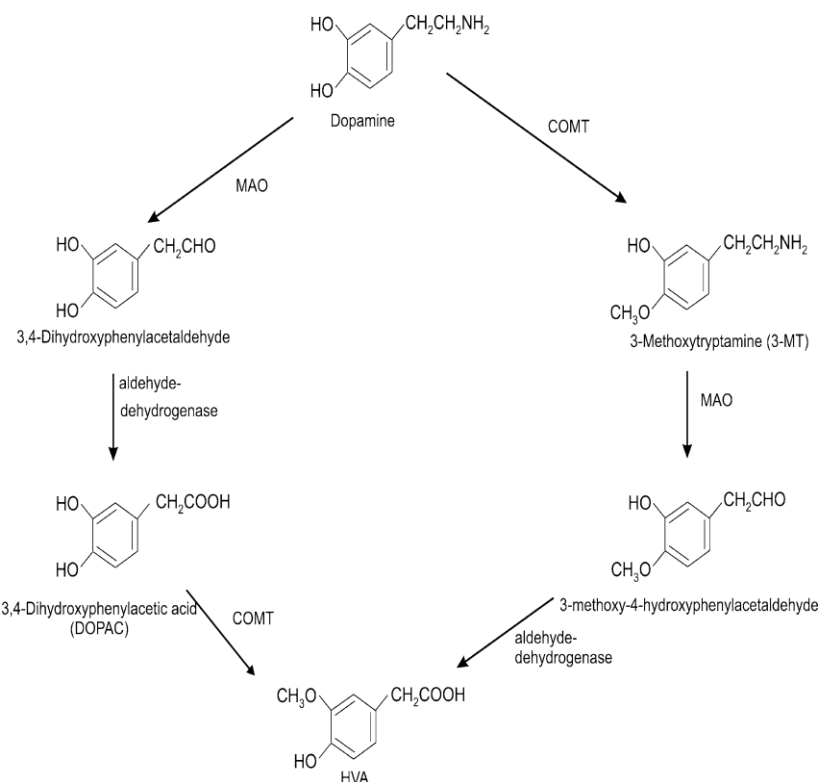
Wzrost stężenia tyrozyny nie prowadzi do większej produkcji L-DOPA;

Nadmiar katecholamin hamuje aktywność hydroksylazy tyrozyny





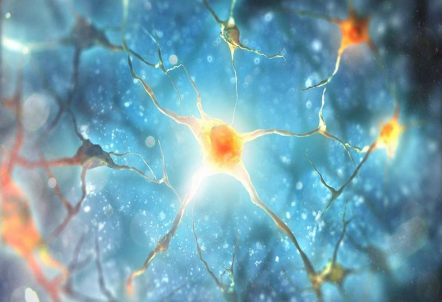
Rozpad Dopaminy



Oksydaza monoaminowa (MAO) i dehydrogenaza aldehydowa odpowiada za rozpad dopaminy do kwasu dihydroksyfenylooctowego (DOPAC).

Dopamina metabolizowana jest w reakcji alternatywnej z katechol-O-metylotransferazy (COMT) do 3-metoksytryptaminy (3-MT).

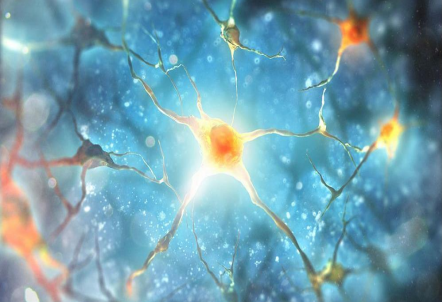
DOPAC i 3-MT są następnie dalej degradowane do kwasu homowanilinowego (HVA)



Zaburzenia metabolizmu dopaminy

- dopamina jest niezbędnym neuroprzekaźnikiem w wielu funkcjach mózgu.
- „dysfunkcja” w transmisji dopaminergicznej wpływa na szereg zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych:
 - a/ nadpobudliwość układu dopaminergicznego prowadzi do akumulacji neuroprzekaźnika w szczelinie synaptycznej i / lub nadwrażliwości receptorów dopaminergicznych.
 - b/Hipoaktywność układu dopaminergicznego jest związana z dysfunkcją ruchową, nieprawidłowym zachowaniem, zaburzeń emocjonalnych.

Zaburzenie równowagi układu dopaminergicznego prowadzi do wystąpienia zróżnicowanych objawów klinicznych



Serotonina

W 1947 r. odkryto serotoninę (lub 5-hidroksytryptaminę; 5-HT)

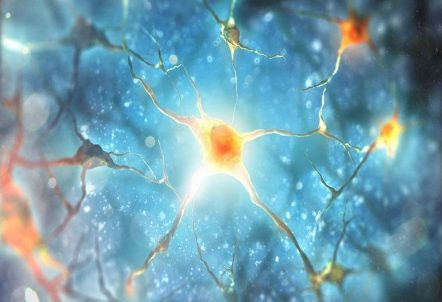
można ją znaleźć w prawie każdym obszarze mózgu,

Stosunkowo dużo neuronów serotonergiczných jest w korze mózgowej, hipokampie, ciele migdałowatym i jądrach podstawy

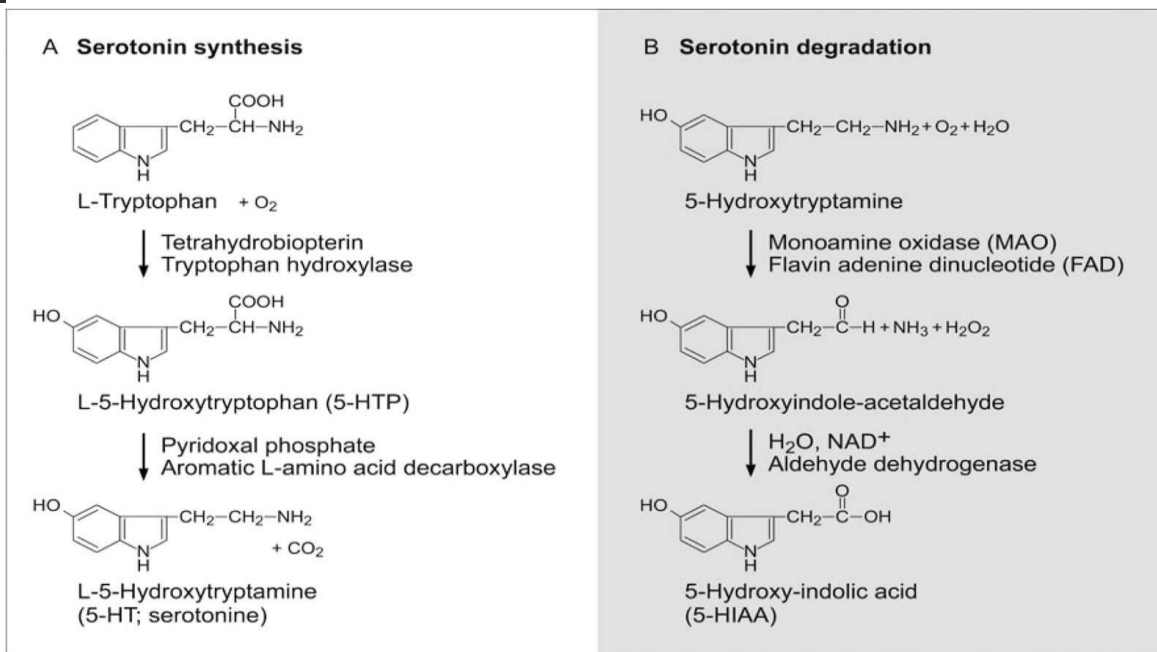
Neurony stanowią jedyne źródło serotoniny w ośrodkowym układzie nerwowym. Prekursorem serotoniny jest niezbędny aminokwas tryptofan, a dostępność tryptofanu stanowi czynnik ograniczający szybkość syntezy serotoniny

Tryptofan przenika barierę krew-mózg za pomocą aktywnej grupy aminowej łączącej się białkiem transportującym przeznaczonym również dla leucyny, lizyny i metioniny. Aktywność tego transportera jest zależna od obecności glukozy i insuliny.



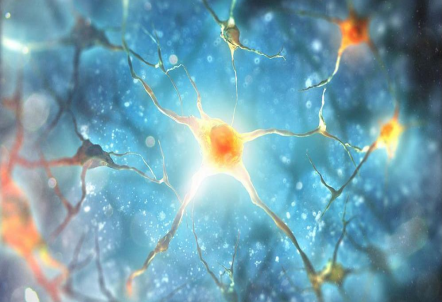


Serotonina



Manipulując poziomem tryptofanu, można bezpośrednio wpływać na biosyntezę serotoniny w mózgu

Przez podawanie obojętnych aminokwasów, takich jak walina, leucyna, izoleucyna lub fenyloalanina w nadmiarze, możliwe jest usunięcie tryptofanu z mózgu.



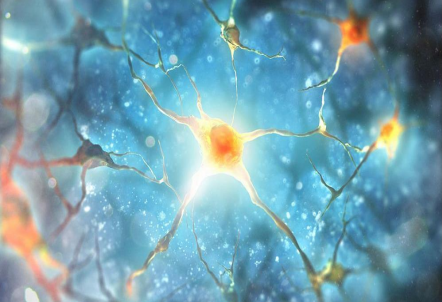
Kwas γ -aminomasłowy – (GABA)

jako mały aminokwas jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym

syntetyzowany jest w reakcji z dekarboksylazą glutaminianu (GAD) zależną od PLP, z kwasu glutaminowego

komórki GABAergiczne w dużych ilościach występują w istocie czarnej i mózdzku. Interneurony GABAergiczne występują najczęściej we wzgórzu, hipokampie i korze mózgowej



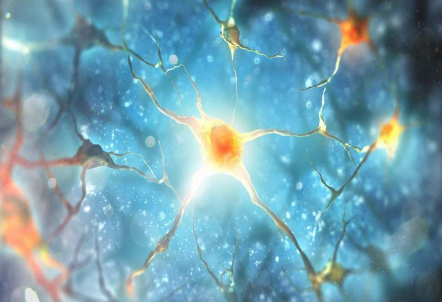


Glutaminian i asparaginian

Są najliczniejszymi neuroprzekaźnikami pobudzającymi w ośrodkowym układzie nerwowym.

pokrewne aminokwasy, tj: kwas homocysteinowy i N-acetyloaspartyloglutaminian, mogą również pełnić funkcję przekaźników

aminokwasy neurotransmitterowe pobudzające uczestniczą w metabolizmie pośrednim, a także w neuronalnej transmisji sygnału, dlatego często występuje problem z rozróżnieniem ich pomiędzy neuroprzekaźnikiem a funkcjami metabolicznymi.



Glutaminian i asparaginian

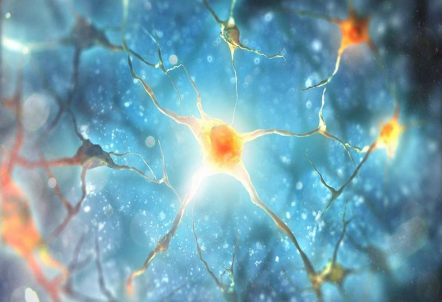
Glutaminian i asparaginian w OUN powstają wyłącznie na drodze lokalnej syntezy, ponieważ żaden aminokwas nie może przekroczyć bariery krew-mózg.

Glutaminian powstaje w cyklu Krebsa w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glutaminianową lub przez transaminację -ketoglutaranu.

Glutaminian gromadzi się w pęcherzykach synaptycznych.

służy jako dawca GABA, najsilniejszego hamującego neuroprzekaźnika aminokwasowego, poprzez dekarboksylację za pomocą dekarboksylazy kwasu glutaminowego





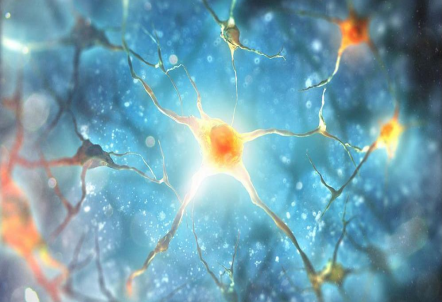
Glicyna

jest zdolna do przekraczania bariery krew-mózg, a zatem może być transportowana z krwi do rdzenia kręgowego i mózgu.

Podobnie jak glutaminian i GABA, glicyna jest częścią wspólnego metabolizmu białek i dzieli z tymi aminokwasami te same trudności w oddzieleniu funkcji metabolicznej i neuroprzekaźnika.

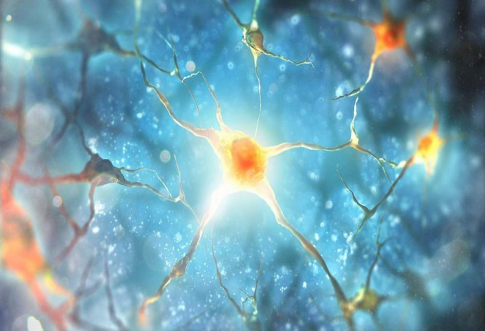
GABA i glicyna są głównymi neuroprzekaźnikami hamującymi w ośrodkowym układzie nerwowym, działającymi poprzez receptory jonotropowe.

glicyna odgrywa również istotną rolę w modulacji receptorów N-metylo-D-asparaginianowych (NMDA)

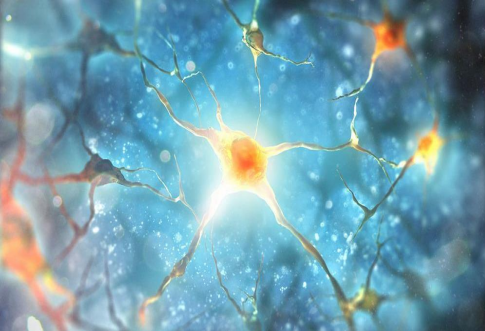


Glicyna

- jest obecna w bardzo wysokich stężeniach w rdzeniu kręgowym i rdzeniu przedłużon
- w ośrodkowym układzie nerwowym jest syntetyzowana z glukozy przez serynę w mitochondriach.
- może być pobierana do komórek za pomocą określonych układów transportujących (GLYT1 i GLYT2), które zawierają transportery zależne od sodu / chlorku



**Dowolne zaburzenie na szlaku syntezy, degradacji i transporcie
neuroprzekaźnika prowadzi do zachwiania równowagi w układach
neurotransmitterowych
i odpowiada za zaburzenia neurotransmisji**

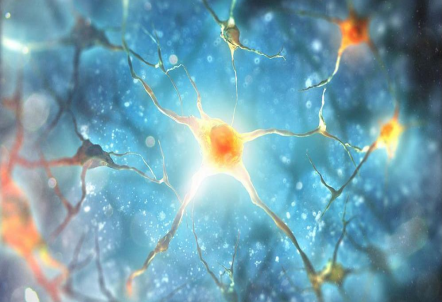


Zaburzenia neurotransmisji

Wrodzone, rzadkie choroby metaboliczne spowodowane nieprawidłowościami w biosyntezie, rozpadzie lub transporcie neuroprzekaźników, jak również w syntezie niezbędnych kofaktorów tj. tetrahydrobiopteryna (BH4).

Są przyczyną występowania zróżnicowanych objawów klinicznymi, od umiarkowanych zaburzeń ruchowych o późnym początku do ciężkich encefalopatii pojawiających się już w pierwszych miesiącach życia.





Pierwotne i wtórne zaburzenia neurotransmisji

- Uważane za jedne z najważniejszych przyczyn ciężkich postępujących encefalopatii, często pojawiających się w okresie noworodkowym lub wczesnoniemowlęcym

CHOROBY ULTRZĄDKIE???

WYKRYWANIE NOWYCH
CHORÓB

NOWE
TECHNIKI/PROCEDURY

ZBYT PÓŹNE ROZPOZNANIE!!



DIAGNOSTYKA

ILOŚCIOWE
OZNACZANIE
AMINOKWASÓW

ILOŚCIOWE
OZNACZANIE
NEUROTRANSMITERÓW

OBJAWY KLINICZNE

METABOLIZM
BH4

METABOLIZM
AB

METABOLIZM
GABA

METABOLIZM
GLN

METABOLIZM
GLY

GLUKOZA

KWAS
FOLIOWY

PIRYDOKSYNA

KWAS
MLEKOWY



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



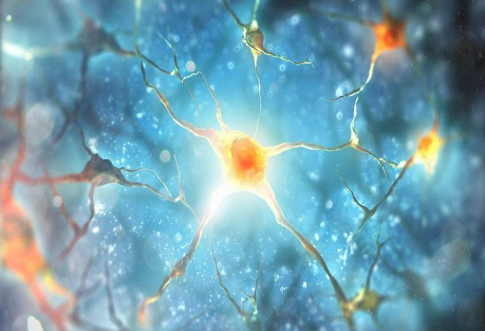
Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny





**KIEDY POWINNIŚMY WYKONAĆ BADANIA W PŁYNIE MÓZGOWO-
RDZENIOWYM???**

**JAKIE BADANIA POWIINY BYĆ WYKONANE W PŁYNIE MÓZGOWO-
RDZENIOWYM???**

KIEDY WYKONAĆ SEKWENCJONOWANIE NOWEJ GENERACJI???



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



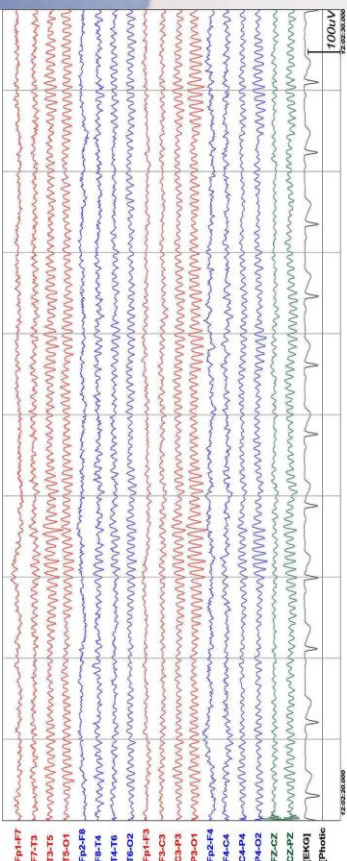
**Rzeczpospolita
Polska**



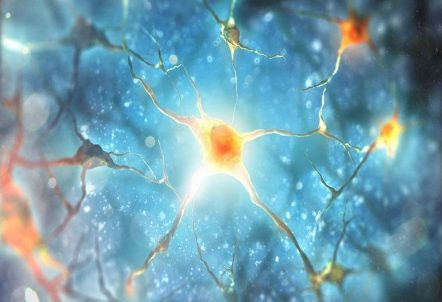
**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny





- **NIEPRAWIDŁOWY WYNIK BADANIA PRZESIEWOWEGO – wysokie stężenie glicyny, alaniny, fenyloalaniny lub podwyższony stosunek Phe/Tyr**
- **Objawy neurologiczne w okresie noworodkowym lub wczesnoniemowlęcym**
- **Prawidłowe podstawowe badania biochemiczne**
- **Prawidłowe/nieprawidłowe EEG/MRI**
- **Prawidłowe/nieprawidłowe stężenia kwasu mlekowego, glukozy, kwasu foliowego**



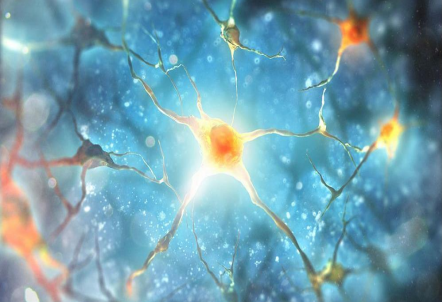
Zaburzenia neurotransmisji

Dostępność diagnostyczna w kierunku zaburzeń neurotransmisji jest mocno ograniczona

Brak zrozumienia wzajemnych zależności/oddziaływań między poszczególnymi neuroprzekaźnikami i neuroprzekaźnikami a ich białkami receptorowymi i transportowymi

Pierwsza diagnostyka w płynie mózgowo-rdzeniowym jest tylko odzwierciedleniem metabolicznych procesów zachodzących w mózgu i wymaga dalszej diagnostyki różnicowej



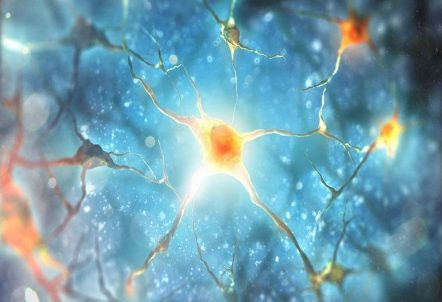


Zaburzenia neurotransmisji – DIAGNOSTYKA

Ze względu na występowanie w płynie m-rdzeniowym gradientu stężeń większości neuroprzekaźników,

PMR musi być pobrany według ściśle opracowanej procedury w danym laboratorium z podziałem na frakcję.

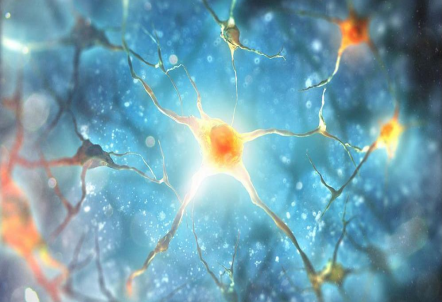
Analiza poszczególnych neurotransmiterów powinna być wykonywana zawsze w tej samej frakcji w celu uzyskania powtarzalności wyników oraz ich wiarygodności.



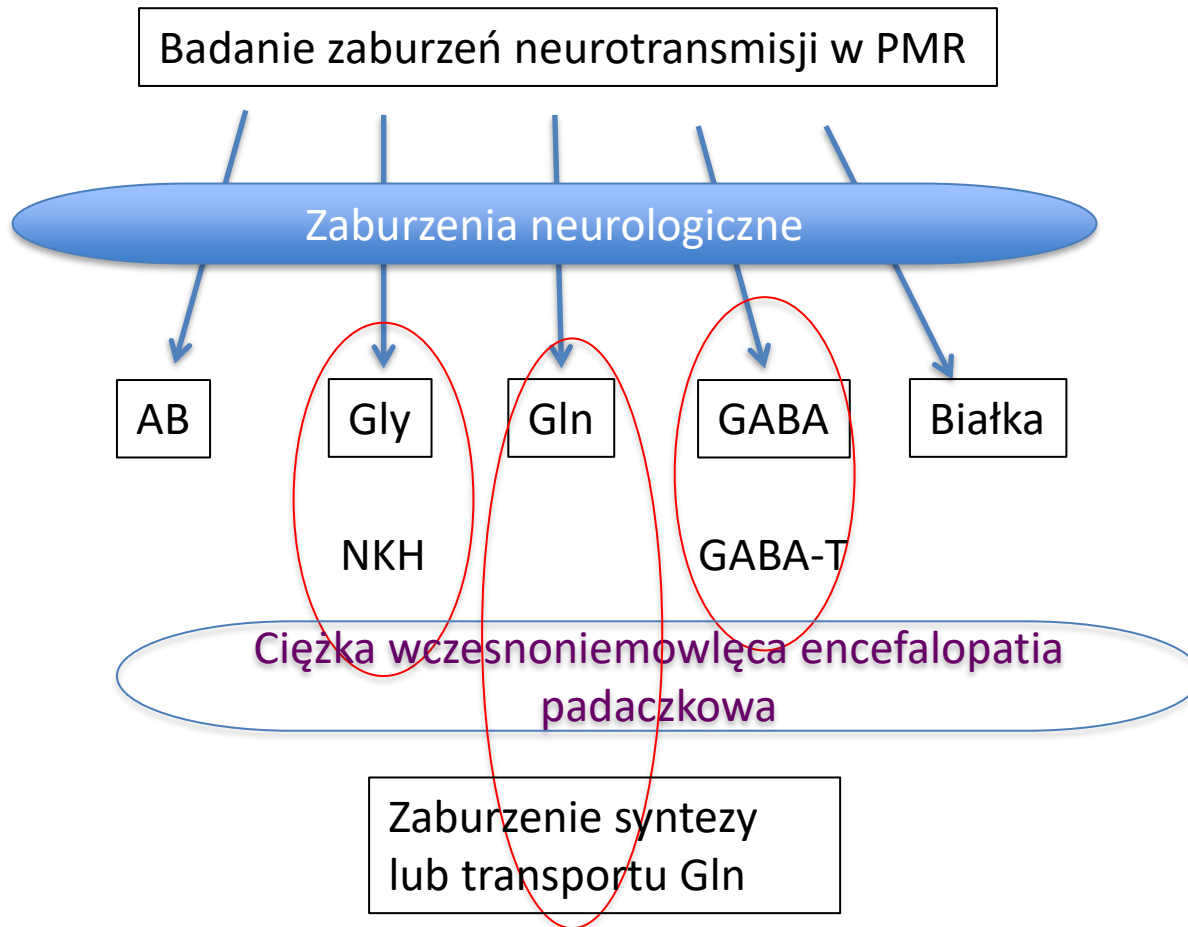
Pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego

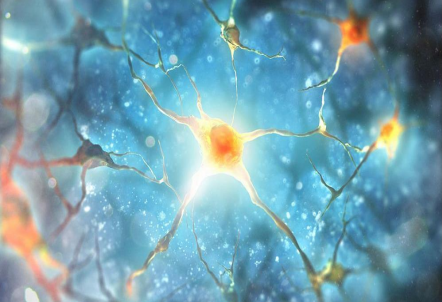
FRAKCJA	OBJĘTOŚĆ (ml) < 1 r ż	Objętość (ml) > 1 r ż	Analizowane związki
Frakcja I	0,5	0,5	Metabolity amin biogennych, 5-MTHF
Frakcja II	0,5	1	aminokwasy
Frakcja III	0,5	1	Badanie ogólne PMR
Frakcja IV	0,5	1	pteryny
Frakcja V	0,5	1	GABA



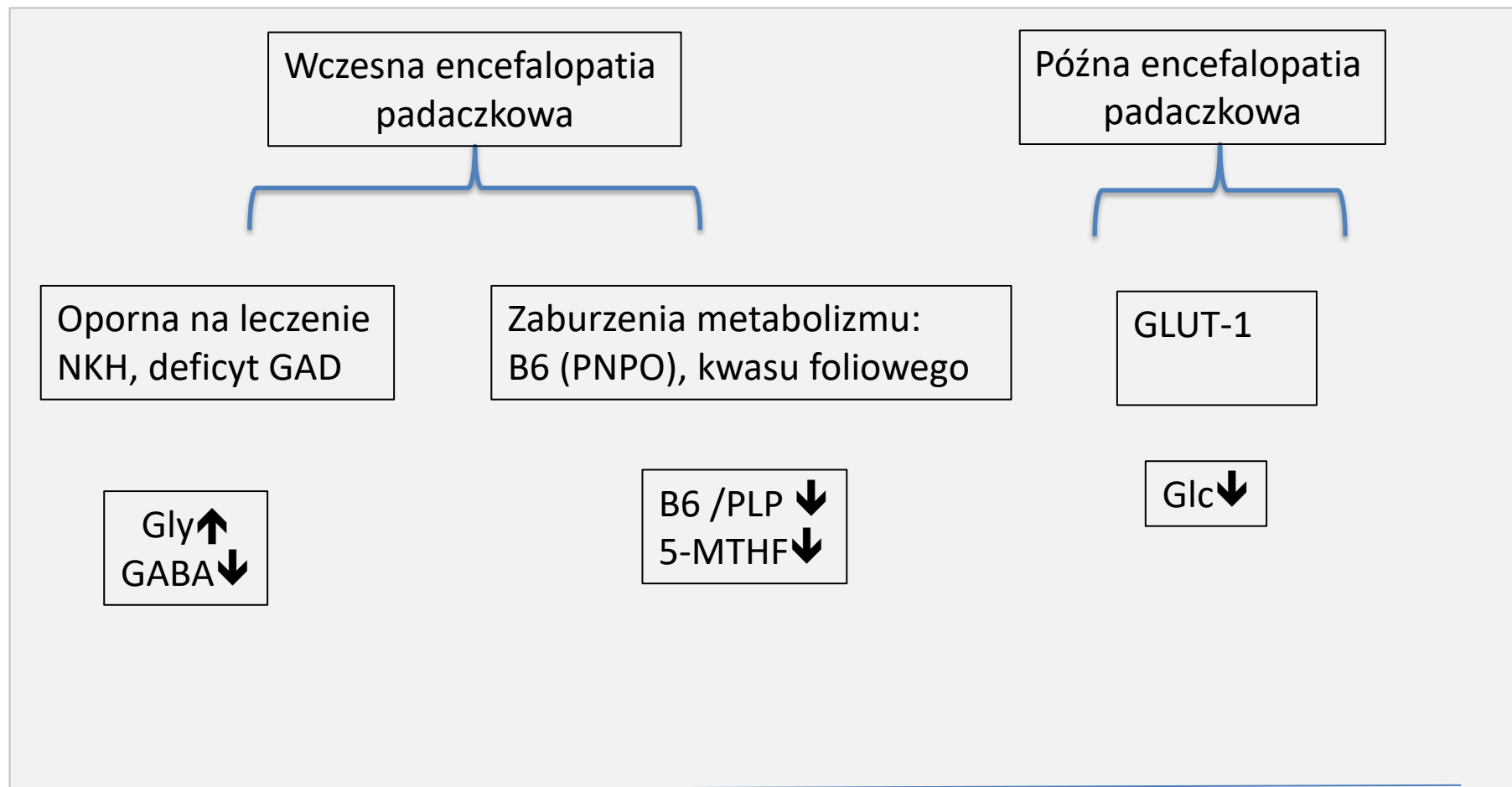


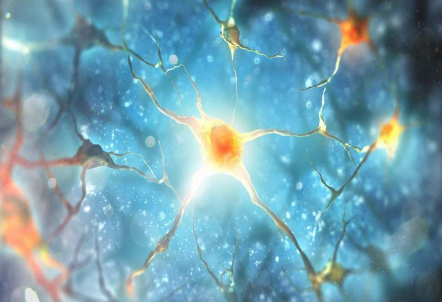
Zaburzenia neurotransmisji – **DIAGNOSTYKA**



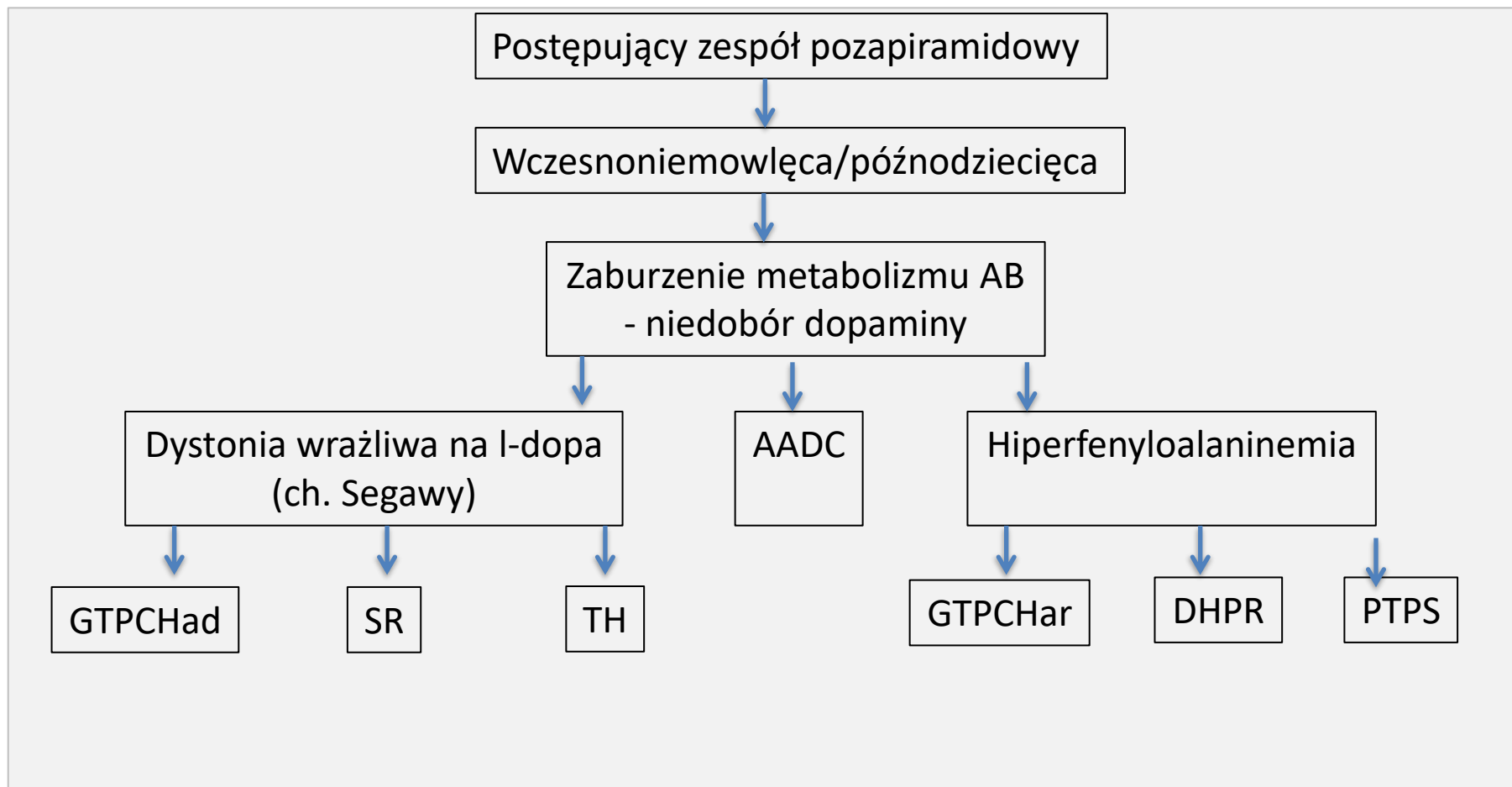


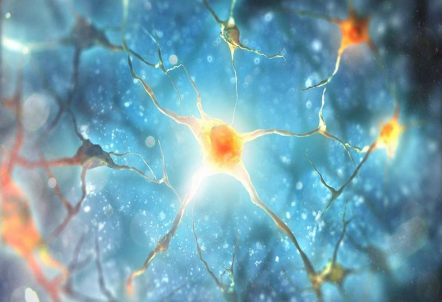
Zaburzenia neurotransmisji





Zaburzenia neurotransmisji – **DIAGNOSTYKA**





Zaburzenia neurotransmisji – **DIAGNOSTYKA**

Krew i mocz – I etap diagnostyczny

Analiza wielu parametrów w tym:

kwask mlekowy, kwas foliowy, B12, B6, prolaktyna, siarczyny, aminokwasy,
profil kwasów organicznych, profil puryn i pirymidyn

Płyn mózgowo-rdzeniowy – II etap diagnostyczny

Analiza parametrów tj: glukoza, białko, kwas mlekowy, kwas pirogronowy
immunoglobuliny oraz analiza neurotransmiterów:
GABA, metabolity kwaśne AB, 5-MTHF, pteryny