

Rola aminokwasów aromatycznych w ośrodkowym układzie nerwowym

dr n.med. Katarzyna Kuśmierska

Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej

Instytut Matki i Dziecka

Aminokwasy definiowane są jako związki zawierające pierwszo lub drugorzędowe grupy aminowe i jedną lub dwie grupy karboksylowe.

- Podstawowy profil aminokwasów oznaczany w osoczu, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym metodą HPLC z detektorem fluorescencyjnym obejmuje 25 aminokwasów w tym aminokwasy drugo rządowe takie jak: prolina i hydroksyprolina.
- Za pomocą tandemowej spektrometrii mas można oznaczyć do 76 aminokwasów i ich pochodnych w suchej kropli krwi lub osoczu nakropionym na bibułę.
- Aminokwasy nie są związane z białkiem z wyjątkiem cysteiny, homocysteiny i tryptofanu



- Aminokwasy syntetyzowane są ze związków pośrednich cyklu kwasu cytrynowego oraz innych ważnych intermediatów procesów metabolicznych
- Metabolizm aminokwasów zabezpiecza bilans azotu
- Podstawowe cząsteczki w metabolizmie azotu: glutamina, glutaminian
- Dehydrogenaza glutaminianowa i syntetaza glutaminowa to główne enzymy kontrolujące wejście azotu do aminokwasów

Funkcje metaboliczne aminokwasów

Aminokwasy są prekursorami związków tj:

- hormony tarczycy
- katecholaminy
- histamina
- serotonina
- melatonina
- związki pośrednie cyklu mocznikowego
- metionina i cysteina są źródłem siarki wchodzącej w skład budowy białka, koenzymu A, tauryny i innych biologicznie ważnych związkach

Aminokwasy można podzielić na 6 grup:

Aminokwasy syntetyzowane z α -ketoglutaranu,

pochodzącego z cyklu kwasu cytrynowego (rodzina glutaminianu): glutaminian oraz wywodzące się z niego glutamina, prolina i arginina;

Aminokwasy syntetyzowane ze szczawiooctanu pochodzącego z cyklu kwasu cytrynowego

(rodzina asparaginianu): asparaginian oraz wywodzące się z niego: asparagina, metionina, treonina i lizyna oraz izoleucyna,

Aminokwasy syntetyzowane z 3-fosfoglicerynianu pochodzącego z glikolizy (rodzina seryny): seryna oraz wywodzące się z niej cysteina i glicyna;

Aminokwasy syntetyzowane z pirogronianu pochodzącego z glikolizy (rodzina pirogronianu): alanina, walina, leucyna

Aminokwasy można podzielić na 6 grup:

Aminokwasy syntetyzowane z fosfoenolopirogronianu pochodzącego z glikolizy i erytrozo-4-fosforanu, pochodzącego ze szlaku pentozofosforanowego

(rodzina aminokwasów aromatycznych): fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan

Aminokwasy syntetyzowane z rybozo-5-fosforanu ze szlaku pentozofosforanowego: histydyna

AMINOKWASY DZIELIMY NA:

- **Aromatyczne:** tyrozyna, fenyloalanina, tryptofan
- **Rozgałęzione:** walina, izoleucyna, leucyna
- **Siarkowe:** metionina, homocysteina, cystyna, cystationina,
- **Ketogenne:** lizyna, leucyna
- **Kwasowe:** glutaminian, asparaginian
- **Neurotransmitterowe:** glicyna, tauryna, glutaminian
- **Cyklu mocznikowego:** glutaminian, arginina, citrulina, ornityna

Aminokwasy aromatyczne: tyrozynemia

tyrozyna → N-acetylowana Tyrozyna

Transaminaza tyrozyny

4-hydroksyfenylopirogronian

Kwas homogentyzynowy

Kwas maleiloacetoctowy

Kwas fumaryloacetoctowy

Fumaryloacetoacetaza

Kwas
fumarowy

Kwas acetoctowy

Kwas bursztynyloacetoctowy

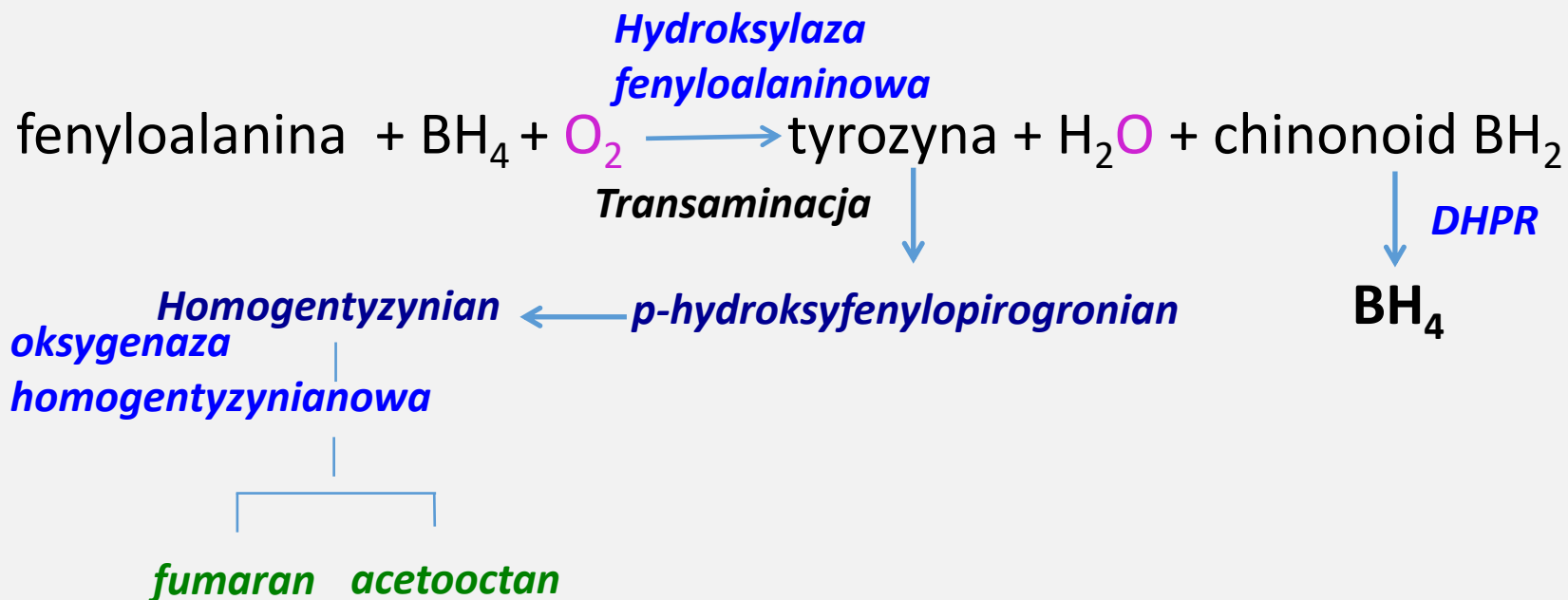
Bursztynyloaceton

Tyrozynemia typ I –
deficyt fumaryloacetoacetazy,
wydalanie
bursztynyloacetonu,
stężenie tyrozyny może być
Prawidłowe.

Tyrozynemia typ II –
deficyt transaminazy tyrozyny,
wysokie stężenie tyrozyny

Aminokwasy aromatyczne: fenyloalanina i tyrozyna

fenyloalanina i tyrozyna mają wspólny ciekawy tor rozkładu
tlen cząsteczkowy wykorzystywany jest do rozerwania pierścienia
aromatycznego



Aminokwasy aromatyczne: alkaptonuria

**BRAK OKSYGENAZY HOMOGENTYZYNIANOWEJ
WYWOŁUJE ALKAPTONURIĘ**

Wysokie stężenie kwasu homogentyzynowego wydalanego w moczu

**Po wystawieniu na działanie powietrza – mocz ciemniej pod wpływem utleniania
i polimeryzacji tworząc substancje podobne do melaniny**

Tryptofan

- Jest kluczowym aminokwasem dla prawidłowego funkcjonowania organizmu,
- Tylko < 1% jest wykorzystywane do syntezy białka, reszta ulega degradacji poprzez dekarboksylację, transaminację, hydroksylację lub utlenianie do związków takich jak:
 - neuroaktywna tryptamina,
 - neuroprotekcyjna melatonina,
 - immunosupresyjna kynurenina (Kyn)
- Około 80–90% Trp jest metabolizowany do Kyn przez tak zwany szlak kynureniny oraz syntezy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD), ważnego kofaktora enzymatycznego.
- szlak metoksyindolowy wykorzystuje około 1–2% L-Trp i dostarcza związków neuroaktywnych, takich jak serotonina i melatonina.

Tryptofan i szlak kynureninowy

- coraz częściej uznawane za ważne źródło neuroaktywnych metabolitów mające istotne znaczenie dla różnicowania stanu patologicznego od stanu prawidłowego.
- metabolizm tryptofanu zależy od odpowiedniej dostępności zarówno witamin jak i minerałów.
- Może być wykorzystywany do syntezy:
 - białek,
 - dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) na szlaku KP
- Jest wykorzystywany do biosyntezy serotoniny i melatoniny na szlaku serotonergicznym.
- Niskie stężenie tryptofanu spowalnia szlak serotonergiczny w mózgu, wpływając na szlak GABA-ergiczny i przyczyniając się do zwiększonej podatności na drgawki
- Melatonina wykazuje właściwości antyoksydacyjne

Produkty rozpadu tryptofanu

- Kynurenina
- Kwas kynureninowy
- Kwas 3-OH-kynureninowy
- Kwas 3-OH-antranilinowy
- Kwas antranilinowy
- Kwas ksantureninowy
- Kwas quinolinowy

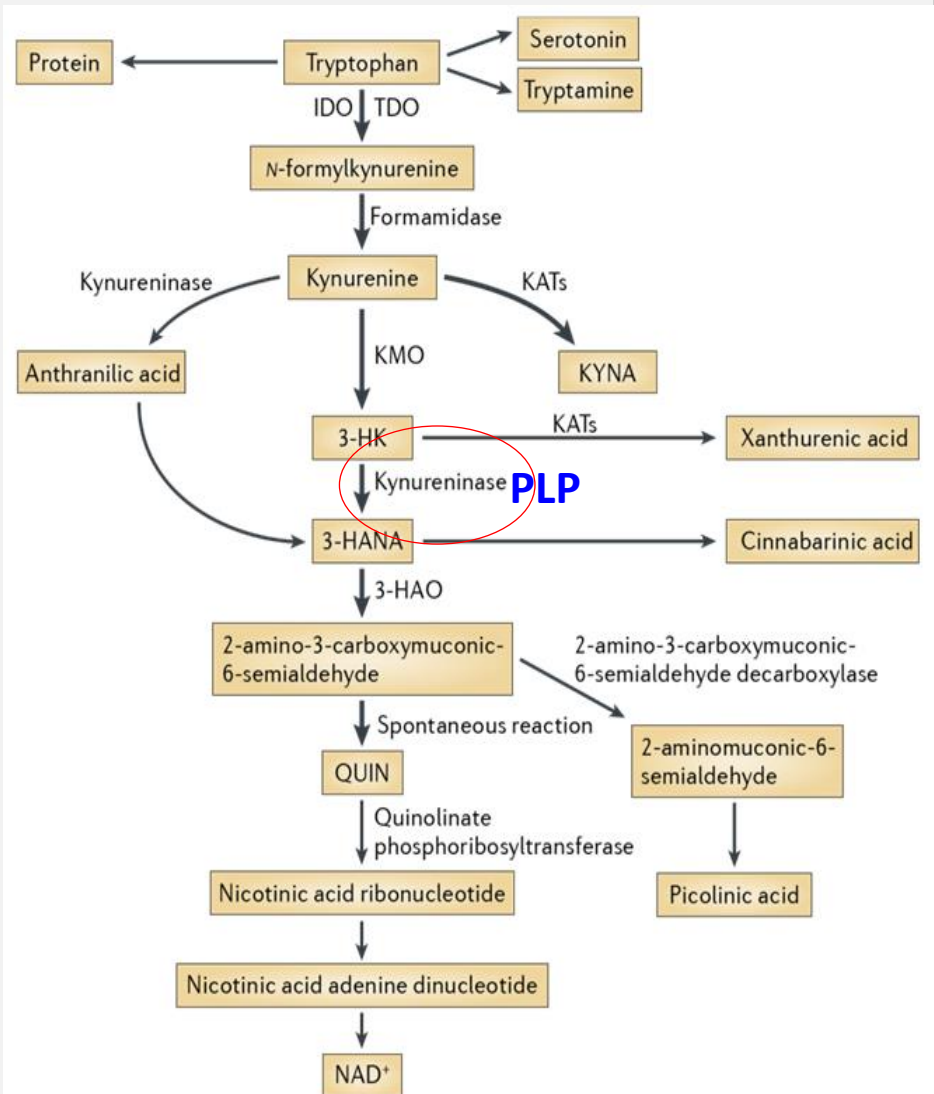
Stosunki pomiędzy poszczególnymi produktami rozpadu tryptofanu mają istotne znaczenie w różnicowaniu padaczek?

Niektóre korelacje stanowią odzwierciedlenie aktywności enzymów uczestniczących w rozpadzie tryptofanu:

KYN/TRP – index aktywności

2,3 –dioksygenazy indoloaminowej (IDO) – enzymu odpowiedzialnego za szybkość rozpadu tryptofanu

3-OHAA/3-OHKYN – index aktywności kynureninazy, enzymu wrażliwego na podaż PLP



Metabolizm tryptofanu

- Szlak kynureninowy jest źródłem kilku związków o zróżnicowanych właściwościach biologicznych, wywołujących czasami przeciwne skutki, dlatego ich stężenie jest silnie regulowane in vivo.
- Zakłócenie równowagi między poszczególnymi metabolitami może prowadzić do negatywnych skutków i wystąpienia ciężkich objawów klinicznych.
- Wiedza na temat metabolizmu tryptofanu wnosi wiele informacji w zakresie strategii terapeutycznych, leczeniu infekcji, przewlekłych stanów zapalnych, nowotworów, problemów z reprodukcją.

Produkty rozpadu tryptofanu na szlaku kynureniny mają bezpośredni wpływ na aktywację immunologiczną?

- W chorobach autoimmunologicznych u pacjentów zaobserwowano wyższe stężenie Kyn w surowicy oraz podwyższony stosunek Kyn /Trp.
- Zwiększona aktywacja szlaku kynureninowego indukowana przez enzym IDO została również zaobserwowana w chorobach takich jak:
 - w toczень rumieniowaty układowy,
 - zapalenie mózgu,
 - reumatoidalne zapalenie stawów,
 - stwardnienie rozsiane.

Szlak metaboliczny kynureniny

Pacjenci z drgawkami w pierwszych dobach życia mają istotnie podwyższone stężenie kynureniny i tryptofanu w moczu.

Podobnie, ale znacznie mniejsze stężenie mają pacjenci dobrze reagujący na leczenie

Pacjenci nie odpowiadający na leczenie mają istotnie podwyższone stężenie 3-OH-kynureniny w moczu

Wzrost stężenia KYN, TRP i KA redukuje aktywność kynureninazy

Aminokwasy aromatyczne

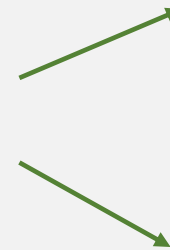
Fenyloalanina

Tyrozyna

Tryptofan



Neuroprzekaźniki
monoaminowe



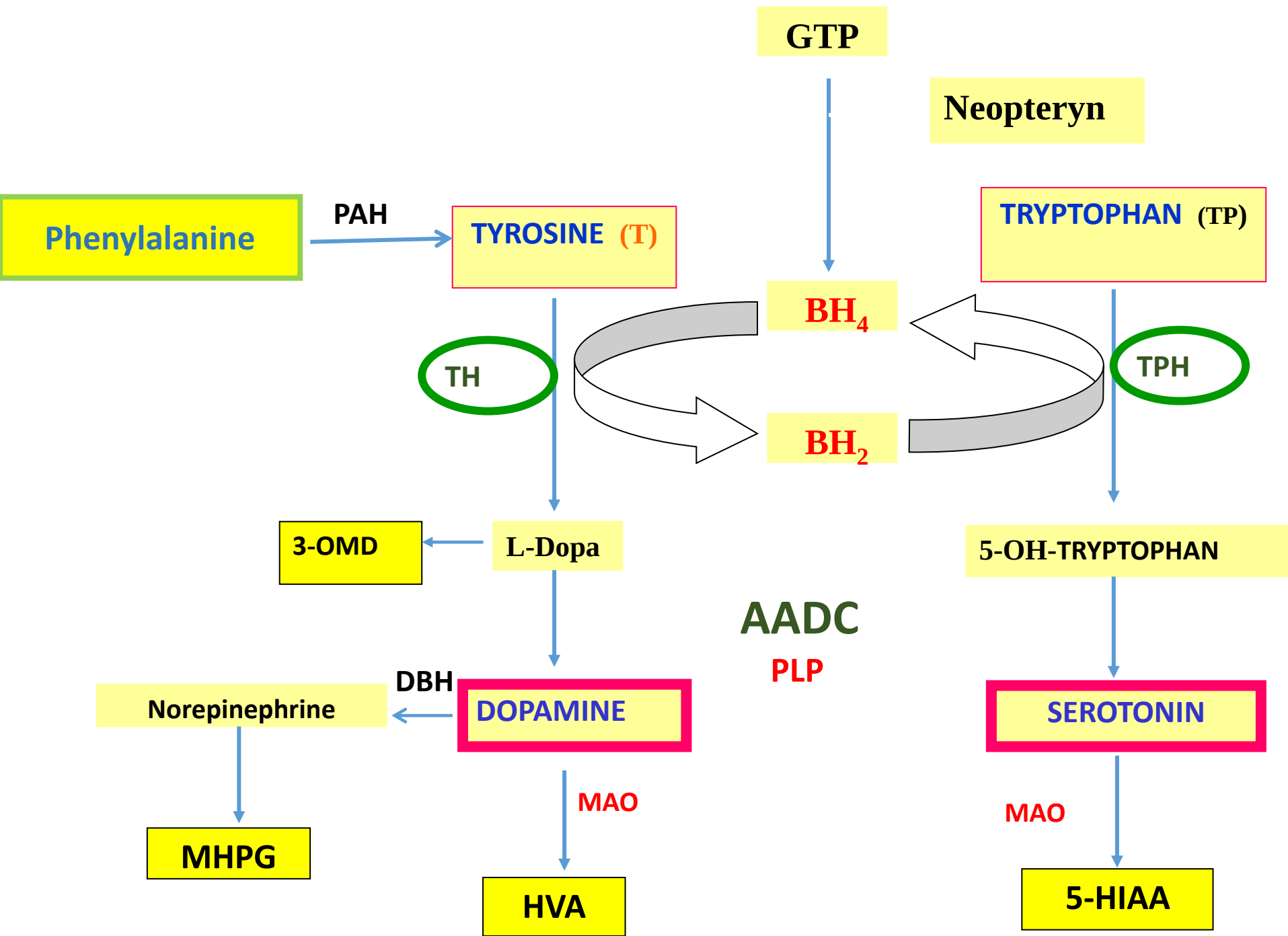
KATECHOLAMINY

SEROTONINA

Monoaminy - Aminy biogenne

- 1/ regulację aktywności ruchowej
- 2/ zachowanie, uczenie i pamięć
- 3/ mechanizm spania, temperaturę ciała oraz ból
- 4/ kontrolę homeostazy ogólnoustrojowej





Diagnostyka zaburzeń monoaminowych neurotransmiterów

Analiza metabolitów amin biogennych w płynie mózgowo-rdzeniowym:

- kwas homowanilinowy (HVA) – metabolit dopaminy,
- kwas 5-hydroksyindolooctowego (5-HIAA) – metabolit serotoniny,
- 3-o-metyldopa (3-OMD) – metabolit l-dopa,
- 3-metoksy-4-hydroksy-feniloetylenoglikol (MHPG) – metabolit noradrenaliny.

Diagnostyka zaburzeń monoaminowych neurotransmiterów

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

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

Analiza metabolitów amin biogennych powinna być wykonywana zawsze w tej samej frakcji w celu uzyskania powtarzalności wyników oraz ich wiarygodności.

Wartości referencyjne

	0- 6 m	6 – 12m	1 – 4 yrs	> 4 yrs
HVA [nmol/L]	300 - 1000	300 - 1000	200 - 800	100 - 600
5-HIAA [nmol/L]	300 - 1000	200 - 800	100 - 600	50 - 400
3-OMD [nmol/L]	100 - 300	< 100	<50	<50



Zaburzenia metabolizmu AB obejmują:

bezpośrednio

- 1/ deficyt enzymów na szlaku metabolizmu AB: TH, TPH, AADC, β HD, MAO;
- 2/ zaburzenia transportu AB

wtórnie

- 1/ Zaburzenia metabolizmu kofaktora BH_4
- 2/ deficyt kofaktora PLP



Zaburzenia metabolizmu AB

Defekty AB i BH4 powodują różne objawy zależne od miejsca bloku metabolicznego

Defekty na szlaku biosyntezy, degradacji i transportu powodują postępujący zespół pozapiramidowy, często pojawiający się w pierwszym roku życia lub dopiero w późnym okresie dziecięcym (12 – 14 lat)

Szerokie spektrum indywidualnych objawów klinicznych i przebiegu choroby obejmuje okresową dystonię, często wrażliwą na leczenie preparatem z l-dopa aż po ciężką postać kliniczną

Deficyt β -hydroksylazy dopaminy – enzymu odpowiedzialnego za szlak syntezy adrenaliny – powoduje objawy kliniczne pojawiające się w późniejszym okresie

Zaburzenia metabolizmu AB

Deficyt β -hydroksylazy dopaminy – enzymu odpowiedzialnego za szlak syntezy adrenaliny oraz deficyt monoaminooksydazy (MAO) – enzymu odpowiedzialnego za bezpośrednią degradację dopaminy i serotoniny – powodują:

- objawy kliniczne pojawiające się w późniejszym okresie;
- Objawy psychiatryczne i agresywne zachowanie

Dystonia wrażliwa na l-dopę (DRD)

Pierwszy raz opisana została przez Segawę, który określił zaburzenie jako „*hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation (HPD)*”

W kolejnych latach Nygaard wprowadził termin „*dopa-responsive dystonia*” dotyczący wszystkich dystonii ustępujących po leczeniu l-dopą.

Charakteryzuje się występowaniem objawów klinicznych tj: dystonia oraz dobową zmienność objawów klinicznych, pojawiających się w pierwszym roku życia lub dopiero w 12 – 14 roku życia.

Dystonia wrażliwa na L-dopę (DRD)

W grupie DRD znajdują się zaburzenia w biosyntezie amin biogennych, w tym trzy opisane jako klasyczna DRD, opisana przez Segawę: wczesna dystonia z dobową fluktuacją objawów ustępująca po podaniu L-dopa:

- autosomalnie dominująca DRD (AD-DRD) spowodowana mutacją w genie GTPCH I (*GCHI*)
- autosomalnie recesywna DRD – spowodowana mutacją w genie hydroksylazy tyrozyny (*TH*)
- autosomalnie recesywna DRD spowodowana mutacją w genie sepiapterynowej reduktazy (*SR*)

Biomarkery DRD

Materiał biologiczny	Prametry/aktywność enzymów	AD-GTPCH	AR-GTPCH	SRD	THD
Osocze/surowica	Fenylalanina	n	n/↑	n/↑ (najczęściej N, czasami b. nieznacznie ↑)	n
	Phe/Tyr po obciążeniu Phe	↑	↑	↑	n
	Bioptryna po obciążeniu Phe	↓	↓	↓	n
	Prolaktyna	n/↑	n/↑	n/↑	↑/n
	Serotonina			↓	
mocz	Całkowita neoptryna	n	n/↓	n	
	Całkowita bioptryna	n	n/↓	n/↓	
	katecholaminy	↓	↓	↓ (okresowa redukcja HVA i 5-HIAA)	

Biomarkery DRD

Material biologiczny	Prametry/aktywność enzymów	AD-GTPCH	AR-GTPCH	SRD	THD
CSF	Całkowita neopteryn	↓	↓	n/↑	n
	Całkowita biopteryna	↓	↓	n/↑	n
	BH4	↓	↓	n	n
	BH2	n	n	↑	n
	Sepiapteryna	n	n	↑	
	HVA	↓	↓	↓	↓
	5-HIAA	↓	↓	↓	n/↓
Fibroblasty	Aktywność GTPCH	↓	↓	n	
	Aktywność SR	n	n	↓	



Mechanizm choroby

- GTPCH i SR katalizują pierwszy i ostatni etap syntezy BH4
- BH4 jest potrzebnym kofaktorem dla hydroksylaz aminokwasów aromatycznych (PAH, TH, TPH), syntazy tlenku azotu (NOS) i monooksygenazy alkiloglicerowej (AGMO);
- PAH odpowiada za przemianę Phe do Tyr w wątrobie a TH i TPH są enzymami kontrolującymi syntezę dopaminy, serotoniny oraz adrenaliny i noradrenaliny w mózgu
- Zaburzenia BH4 (AR-GTPCHD, PTPS, DRD) mogą prowadzić do hiperfenyloalaninemii (HPA) i znacznych monoaminergicznych i katecholaminergicznych niedoborów
- Zaburzenia BH4 (SRD, AD-GTPCHD, czasami również AR-GTPCHD) – bez HPA mogą powodować niedobory neuroprzekaźników w PMR

Deficyt hydroksylazy tyrozyny (THD)

- Enzym potrzebny do syntezy l-dopa i jej metabolitów DA, NE, E, opisany po raz pierwszy przez Ludecke w 1996 r.
- THD opisany został po raz pierwszy jako ciężkie zaburzenia neurologiczne odporne na leczenie preparatem L-dopa, spowodowane homozygotyczną mutacją (L205P) w genie *TH*, (6 pacjentów opisanych)
- Dwa fenotypy kliniczne (A i B):
 - Fenotyp kliniczny A – „łagodna postać” dobrze reagująca na leczenie (DRD), pojawiająca się w pierwszych miesiącach życia lub w okresie późno dziecięcym; (69% pacjentów ma postać typu A)
 - Fenotyp kliniczny B – „ciężka postać” – ciężka postępująca encefalopatia pojawiająca się już w pierwszych miesiącach życia, źle odpowiadająca na leczenie

Transportery neurotransmiterów

- Neurotransmitery przechowywane są w pęcherzykach presynaptycznych;
- Transport neuroprzekaźników do pęcherzyków wymaga obecności transportera VMAT2;
- Uwalnianie neuroprzekaźników do szczeliny synaptycznej wymaga obecności specyficznych receptorów z grupy D na błonie pre-i postsynaptycznej;
- Katabolizm AB ma miejsce w szczelinie synaptycznej, gdzie aktywowane są enzymy: MAO i COMPT (katechol-orto-metylotransferaza);
- DA i SER usuwane są ze szczeliny synaptycznej przez odpowiednio transportery: DAT i SERT.

Transportery neurotransmiterów monoaminowych

Deficyt transportera dopaminy (DAT) – spowodowany mutacjami genu SLC6A3 (5p15.33), kodującego transporter dopaminy pośredniczący w aktywnym wychwycie pozakomórkowej dopaminy.

Pierwsze objawy kliniczne pojawiają się już w okresie noworodkowym lub wczesnoniemowlęcym,

Pacjenci mają podwyższone stężenie HVA oraz prawidłowe stężenie 5-HIAA w PMR.

Deficyt pęcherzykowego transportera dopaminy - serotoniny (VMAT2) – spowodowany jest mutacjami genu SLC18A2, kodującego pęcherzykowy transporter dopaminy-serotoniny.

Profil AB w PMR może być całkowicie prawidłowy; natomiast w moczu może być nieznacznie podwyższone stężenie HVA i 5-HIAA oraz obniżone stężenie NE i DA.

Transportery neurotransmitterów monoaminowych

DATD – markerem biochemicznym jest podwyższony stosunek HVA/5-HIAA;

Prawidłowy stosunek HVA/5-HIAA u pacjentów > okresu noworodkowo to 1,5 – 2. Stosunek HVA/5-HIAA u pacjentów z objawami w okresie wczesnodziecięcym jest > 2

VMAT2 – profil metabolitów AB w PMR może być prawidłowy, natomiast nieprawidłowy jest profil monoamin w moczu

Nieprawidłowy transporter VMAT może mieć negatywny wpływ na upakowanie dopaminy w pęcherzykach a tym samym na prawidłową neurotransmisję.

DATD	
HVA:5-HIAA (CSF)	↑
HVA i 5-HIAA	N
VMAT2	
HVA:kreatynina	N/↑
HVA i 5-HIAA (CSF)	N

Deficyt dekarboksylazy L-aminokwasów aromatycznych

L-dopa i 5-HT ulegają dekarboksylacji do dopaminy i serotoniny w reakcji PLP-zależnej.

Dopamina ulega hydroksylacji do noradrenaliny w reakcji BHD a następnie do adrenaliny a serotonina do melatoniny.

po uwolnieniu, aktywne monoaminy działają na odpowiednie receptory, a następnie są albo ponownie wychwytywane do zakończeń presynaptycznych i przechowywane w pęcherzykach, albo są metabolizowane przez działanie oksydazy monoaminowej (MAO) i metylotransferazy katecholowej (COMT) do HVA i 5-HIAA i MHPG.

Profil metabolitów AB: niskie stężenie HVA i 5-HIAA oraz podwyższone stężenie 3-OMD, L-dopa oraz 5-HT w PMR. W moczu wydalone są metabolity: kwas wanilinomlekowy (VLA) i jego pochodne: kwas wanilinopirogronowy (VPA) oraz N-acetylovaniloalanina (AVA).

Defekty w katabolizmie AB

Deficyt monoaminoksydazy (MAO-A, MAO-B) – brak katabolizmu dopaminy, serotoniny i noradrenaliny

Deficyt MAO został opisany jako:

- wada wpływająca tylko na MAO-A, związany z chromosomem X, a szczegółowe informacje były dostępne tylko u 8 z 14 mężczyzn dotkniętych tą chorobą;
- połączony niedobór zarówno MAO-A i MAO-B związany z chorobą Norrie, która jest zespołem sprzężonym z chromosomem X charakteryzującym się wrodzoną ślepotą, utratą słuchu i zmienną niepełnosprawnością umysłową, spowodowany delecjami chromosomów X
- połączony niedobór MAO-A i MAO-B

Markery biochemiczne MAO-A i MAO-B

MAO A deficyt	
3-metoksytyramina (U)	↑↑
5-HIAA (CSF)	↓
5-HIAA (U)	↓-N
HVA (CSF)	↓
HVA (U)	↓-N
MAO-A (FB)	↓↓
MHPG (U, CSF)	↓-N
Normetanefryna (U)	↑↑
Kwas wanilinomigdałowy (VMA, U)	↓
Serotonina (P)	↑
MAO-B deficyt	
Fenyloetyloamina (U)	↑

MAO-A def. powoduje wzrost stężenia w moczu i osoczu substratów MOA, tj: 5-HT, normetanefrynę, 3-metoksytyraminę, tyraminę oraz obniżenie produktów MAO tj: 5-HIAA, HVA, VMA, MHPG

Podwyższone stężenie fenyloetyloaminy w moczu zostało zaobserwowane w deficycie MAO-B.

