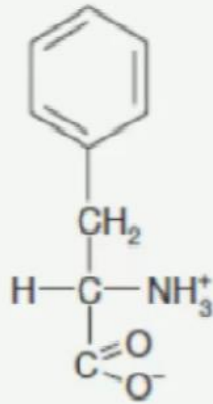


Aminokwasy aromatyczne w diagnostyce zaburzeń neurometabolicznych

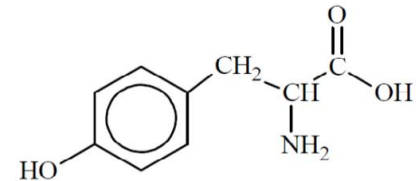
dr n.med. Katarzyna Kuśmierska
Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej
Instytut Matki i Dziecka

Aminokwasy aromatyczne

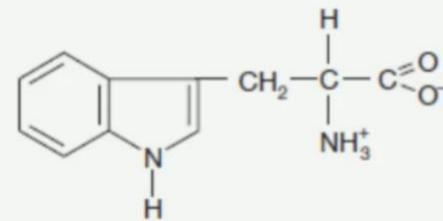
Fenylalanina



Tyrozyna

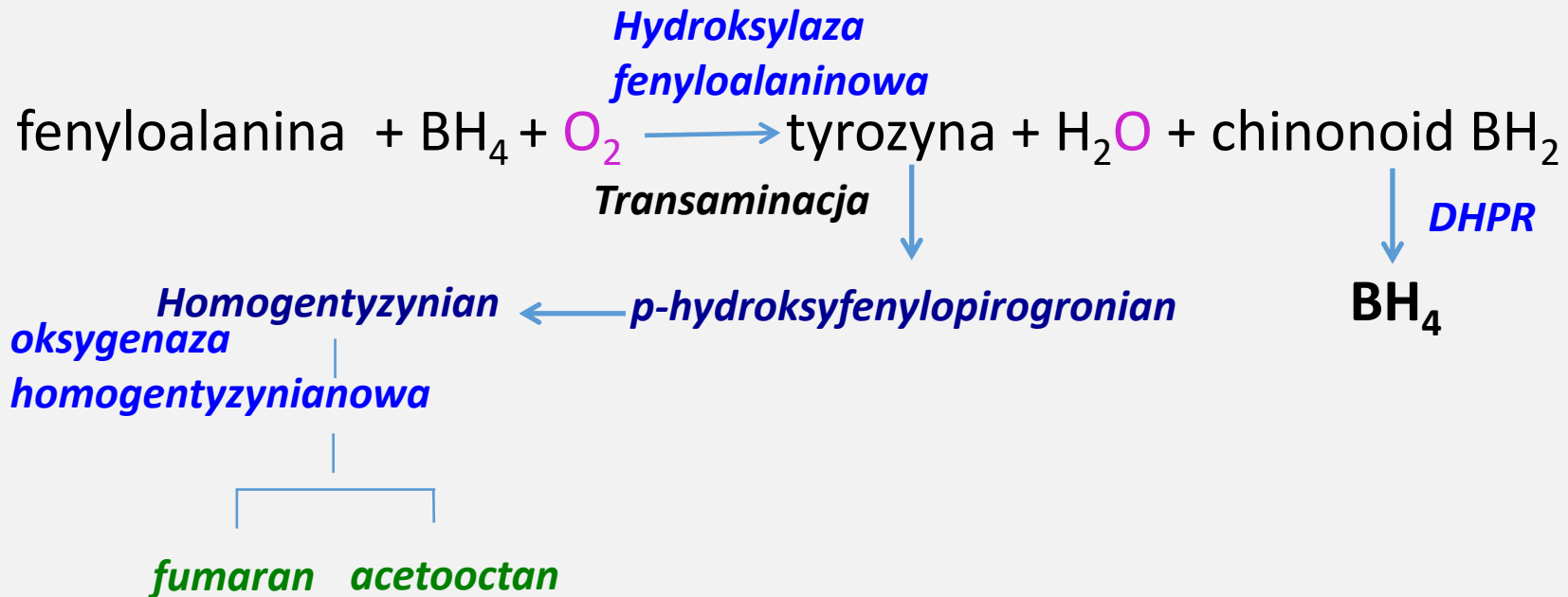


Tryptofan



Metabolizm fenyloalaniny i tyrozyny

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



Metabolizm tyrozyny

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,
wydalenie
bursztynyloacetonu,
stężenie tyrozyny może być
Prawidłowe.

Tyrozynemia typ II –
deficyt transaminazy tyrozyny,
wysokie stężenie tyrozyny

Tryptofan

Enzym – syntaza tryptofanowa może dysocjować na dwie podjednostki α i β_2
Podjednostki katalizują częściowe reakcje, które prowadzą do syntezy tryptofanu:

indolo-3-fosfoglicerol $\xrightarrow{\text{podjednostka } \alpha}$ indol + aldehyd-3-P-glicerynowy

indol + seryna $\xrightarrow{\text{podjednostka } \beta_2}$ tryptofan + H₂O

Każde miejsce aktywne na podjednostce β_2 zawiera PLP

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,
 - neuroprotekcynowa 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.

Fenyloalanina:

Podwyższone stężenie fenyloalaniny w suchej kropli krwi w badaniu przesiewowym noworodków – dalsza diagnostyka różnicowa

Prawidłowe stężenie Phe w osoczu: 21 – 93 $\mu\text{mol/L}$

Prawidłowe stężenie Phe w moczu: < 41 $\mu\text{mol/L}$

$\text{Phe/Tyr} \approx 1$

Podwyższone stężenie fenyloalaniny, obniżone/w dolnej granicy normy stężenie tyrozyny i podwyższony stosunek Phe/Tyr odpowiada

HIPERFENYLOALANINEMII

Hiperfenyloalaninemia a ośrodkowy układ nerwowy

- Wysokie stężenie fenyloalaniny hamuje aktywność hydroksylazy tyrozyny, co tłumaczy niskie stężenie dopaminy u pacjentów z fenyloalaniną $> 30\text{mg}$
- Fenyloalanina współzawodniczy z pozostałymi aminokwasami aromatycznymi (tyrozyną i tryptofanem) i aminokwasami rozgałęzionymi o przyłączenie do nośnika pokonującego barierę krew-mózg

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



Neurotransmitery i ich rola w neuroransmisji

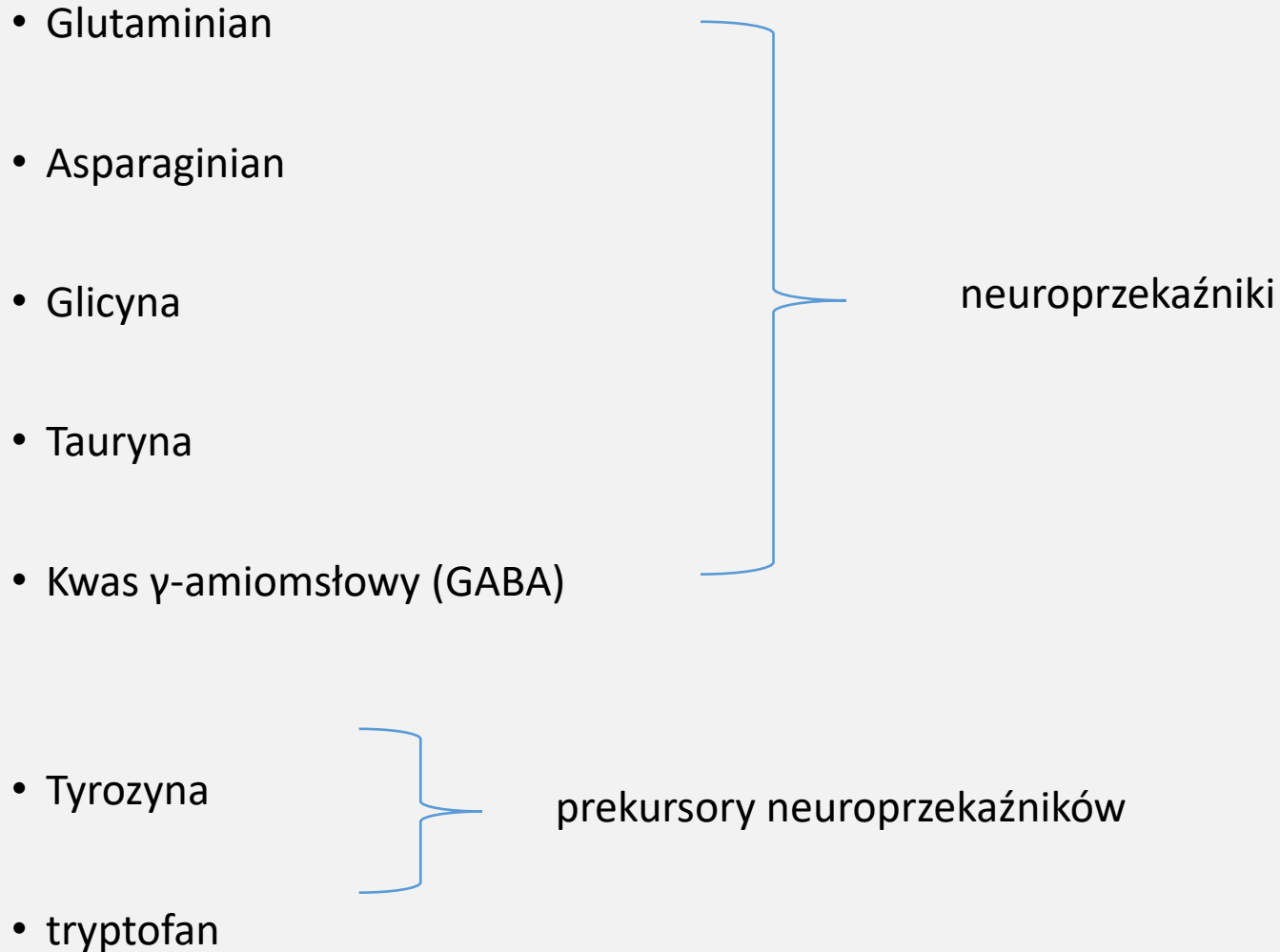
wiele różnych białek receptorowych i transporterów – przypisanych jest do jednego neuroprzekaźnika

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

Aminokwasy jako neuroprzekaźniki



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.



Aminokwasy aromatyczne

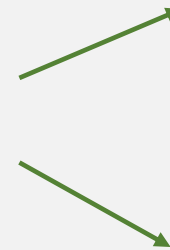
Fenyloalanina

Tyrozyna

Tryptofan



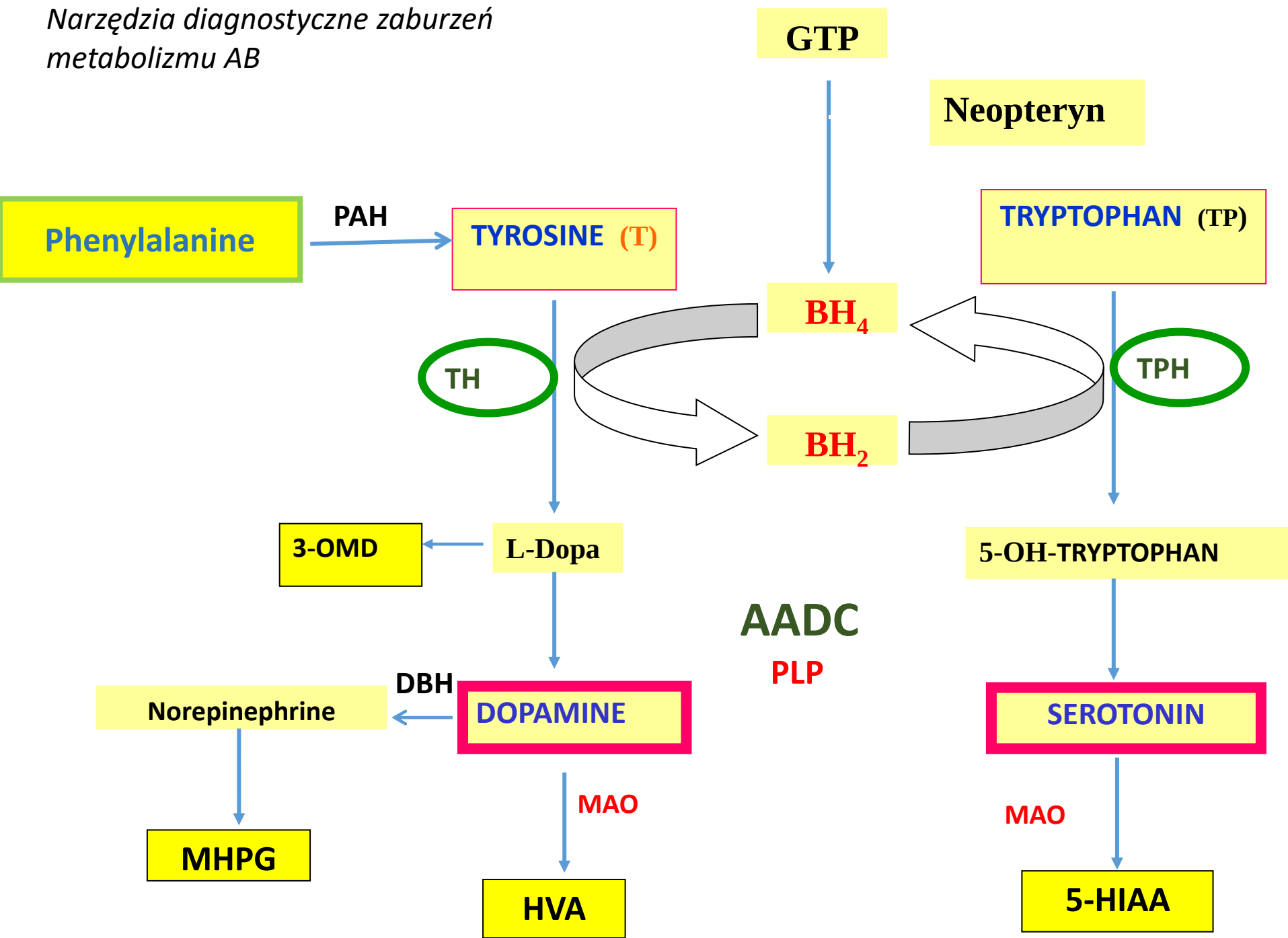
Neuroprzekaźniki
monoaminowe



KATECHOLAMINY

SEROTONINA

*Narzędzia diagnostyczne zaburzeń
metabolizmu AB*



Aminokwasy aromatyczne w syntezie dopaminy i serotoniny

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.



Dopamina

Z klinicznego punktu widzenia dopamina cieszyła się i nadal cieszy 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.

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 kumulacji 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-hydroksytryptaminę; 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.

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.

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



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 wtórne – synteza głównego kofaktora w syntezie amin biogennych

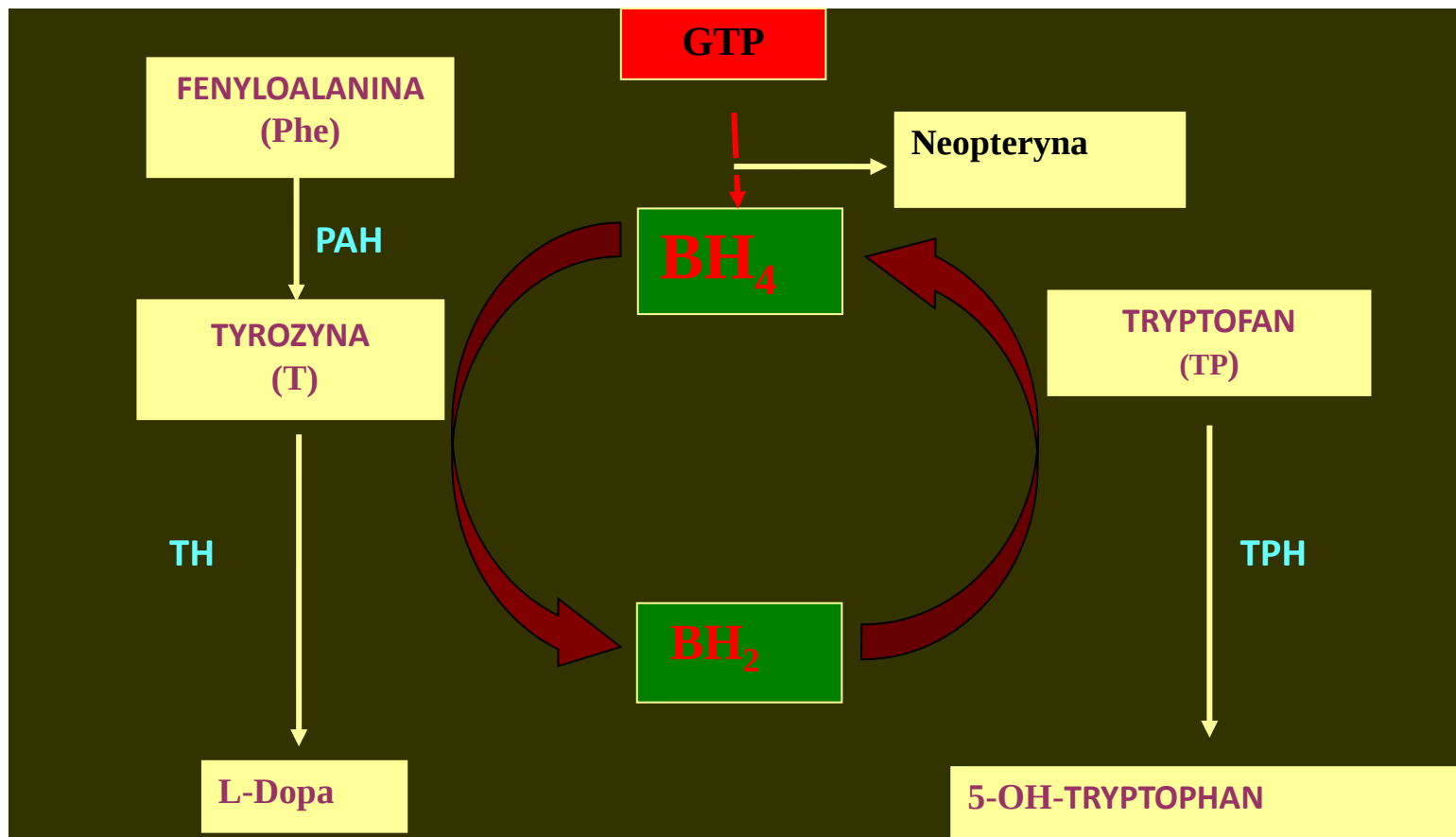


KOFAKTORA HYDROKSYLAZY:

- FENYLOALANINY
- TYROZINY
- TRYPTOFANU



Metabolizm fenyloalaniny



Defekty biosyntezy BH₄

z hiperfenyloalaninią:

1. Deficyt cyklohydrolazy GTP dziedziczonej autosomalnie recesywnie (arGTPCH)
2. Deficyt syntazy 6-pirogonylo – tetrahydropterynowej (PTPS)

bez hiperfenyloalaninii:

1. Deficyt reduktazy sepiapterynowej (SR)
2. Deficyt cyklohydrolazy GTP dziedziczonej autosomalnie dominująco (adGTPCH)

Defekty regeneracji BH₄ występujące z hiperfenyloalaninią

1. Deficyt reduktazy dihydropterynowej (DHPR)
2. Deficyt dehydratazy pterynowo-4a-karbinolaminowej (PCD)

Materiał

A. Płyn mózgowo-rdzeniowy:

- I Frakcja: 0,5 ml - HVA, 5-HIAA, 3-OMD oraz MTHF
- II Frakcja: 1 ml - aminokwasy
- III Frakcja: 2 ml - biochemia (kwas mlekowy, pirogronowy)
- IV Frakcja: 1 ml - GABA,
- V Frakcja: 1 ml - GABA i pteryny

B. Osocze:

Krew pobrana na heparynę litową; aminokwasy

C. Krew pobrana na bibułę

D. Mocz: 12 godzinna zbiórka moczu zbierana do ciemnego pojemnika



Wpływ czynników zewnętrznych na wynik pteryn:

1. w moczu – ubogo białkowa dieta prowadzi do obniżenia stężeń neopteryny i biopteryny, co można mylnie zinterpretować jako podejrzenie deficytu GTPCH
2. W płynie m-rdzeniowym - infekcje wirusowe i bakteryjne w ośrodkowym układzie nerwowym podwyższają stężenie neopteryny,
3. Limfocyty T stymulują wzrost aktywności GTPCH w makrofagach, a pozostałe enzymy mają niską aktywność,
4. Ostatecznie w makrofagach zamiast syntezy BH4 gromadzi się NH₂TP, który następnie po hydrolizie przez fosfatazy jest wydalany w postaci dihydroneopteryny lub neopteryny



Stężenie neopteryny jest podwyższone zawsze kiedy aktywowany jest układ immunologiczny;

Wszystkie enzymy uczestniczące w syntezie i regeneracji BH4 są w makrofagach ale tylko GTPCH odpowiada na stymulację wzmożoną aktywnością – z powodu dużego stężenia GTP w stymulowanych komórkach???

Podwyższone stężenie Neopteryny jest również dobrym wskaźnikiem chorób autoimmunologicznych

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

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*)

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.

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 ROZOPOZNANIE!!





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



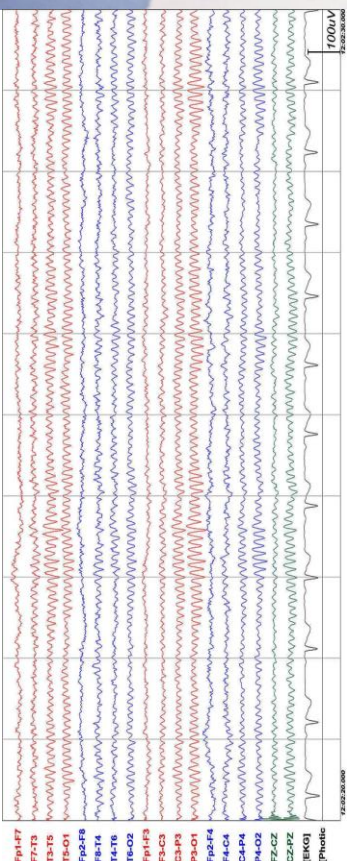
Rzeczpospolita
Polska



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 neuroprzekaznikami i neuroprzekaznikami 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



Pierwotne i wtórne zaburzenia neurotransmisji są związane z:

BIOSYNTeza
DEGRADACJA
UPAKOWANIE W PĘCHERZYKACH
PRZECHOWYWANIE
UWALNIANIE
WYCHWYT ZWROTNY
PODTYPY RECEPTORÓW
WEWNĄTRZKOMÓRKOWY SYGNAŁ
HOMEOSTAZA (FUNKCJA KOMÓRKI GLEJOWEJ)



Ograniczanie zmian stężeń poszczególnych NTs względem siebie ma ogromne znaczenie dla:

- zaburzeń behawioralnych,
- starzenia się,
- w chorobach neurodegeneracyjnych,
- epilepsji,
- zaburzeń nadpobudliwości psychoruchowej,
- choroby Huntington'a,
- depresji.

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





DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ