

Metabolizm aminokwasów – charakterystyka, różnicowanie i diagnostyka medyczna

dr n.med. Katarzyna Kuśmierska

Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej

Instytut Matki i Dziecka



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Instytut
Matki i Dziecka

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Biochemia i medycyna

- Biochemia ma istotne znaczenie w rozwój wiedzy dotyczącej nie tylko metabolizmu komórek, ale również immunologii, farmakologii, toksykologii czy procesów zapalnych.
- Ścisła zależność pomiędzy biochemią i medycyną pokazuje jak życie, które znamy zależy od reakcji i procesów biochemicznych zachodzących w pojedynczej komórce.
- Wyzwania przed, którymi stają dzisiaj biochemicy:
 - zrozumienie czym jest zdrowie, czyli zrozumienie mechanizmów i procesów zachodzących w zdrowej komórce
 - zrozumienie czym jest choroba, czyli zrozumienie patomechanizmów odpowiedzialnych za wystąpienie określonych objawów klinicznych.

Biochemia i medycyna

Badania biochemiczne z jednej strony przyczyniają się do wyjaśnienia wielu aspektów choroby, z drugiej odsłaniają nowe dziedziny jeszcze nie do końca poznane lub zrozumiałe, co stanowi duże wyzwanie zarówno dla biochemików jak i klinicystów.

**WSPÓŁPRACA MIĘDZY BIOCHEMIKAMI A KLINICYSTAMI MA OGROMNE
ZNACZENIE W POSZERZANIU WIEDZY NA TEMAT METABOLIZMU KOMÓRKI W
RÓŻNYCH ZDROWYCH I PATOLOGICZNYCH WARUNKACH**

Rozwój diagnostyki biochemicznej wrodzonych wad metabolizmu i neurometabolizmu

Choroba to dynamiczny proces modyfikujący ekspresję określonych genów tym samym przyczyniając się do zmian zarówno w powstałych białkach jak i zsintetyzowanych metabolitach.

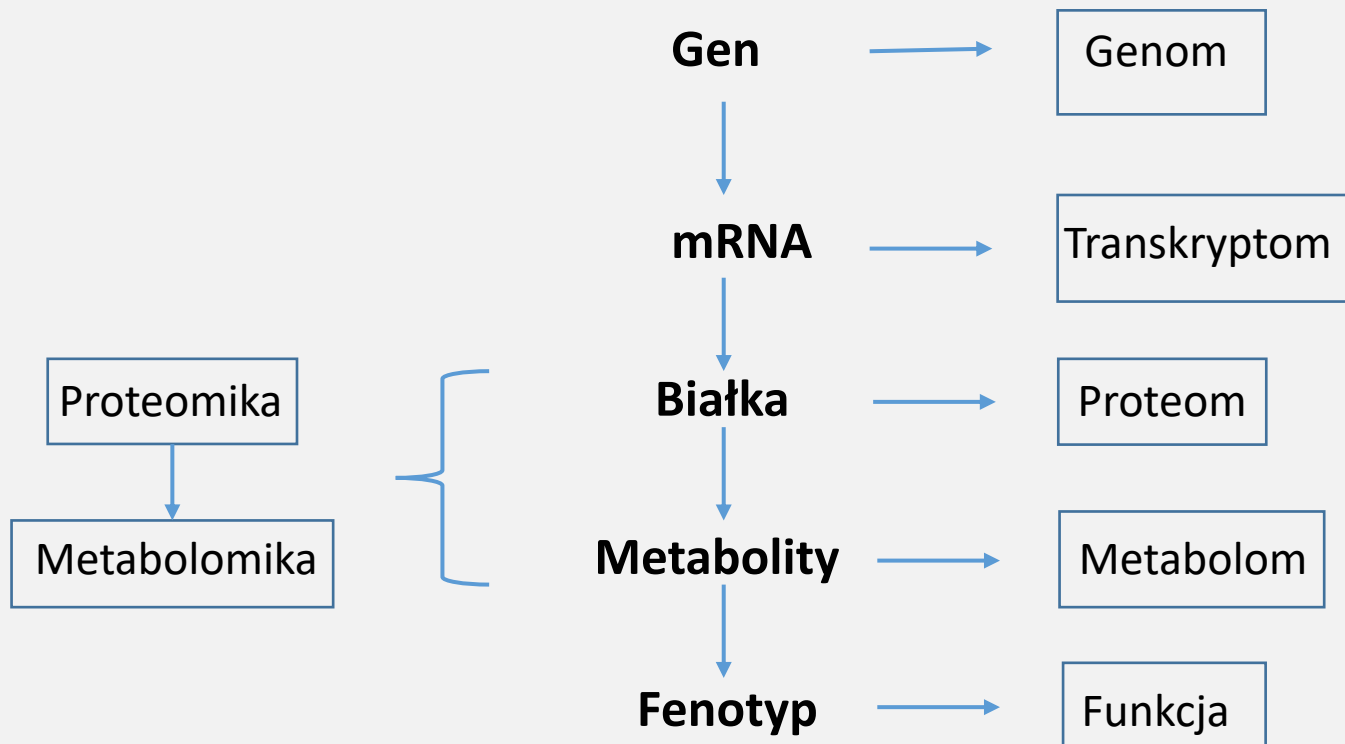
Pojedyncze markery charakteryzują się niską czułością i specyficznością a ich wartość diagnostyczna stanowi jedynie pewne zawężone kryterium rozpoznania.

Intensywny rozwój nowych technologii, spektrometrii mas i biochemii otwiera przed medycyną nowe możliwości diagnostyczne, umożliwia analizę wielu związków w tym samym czasie.

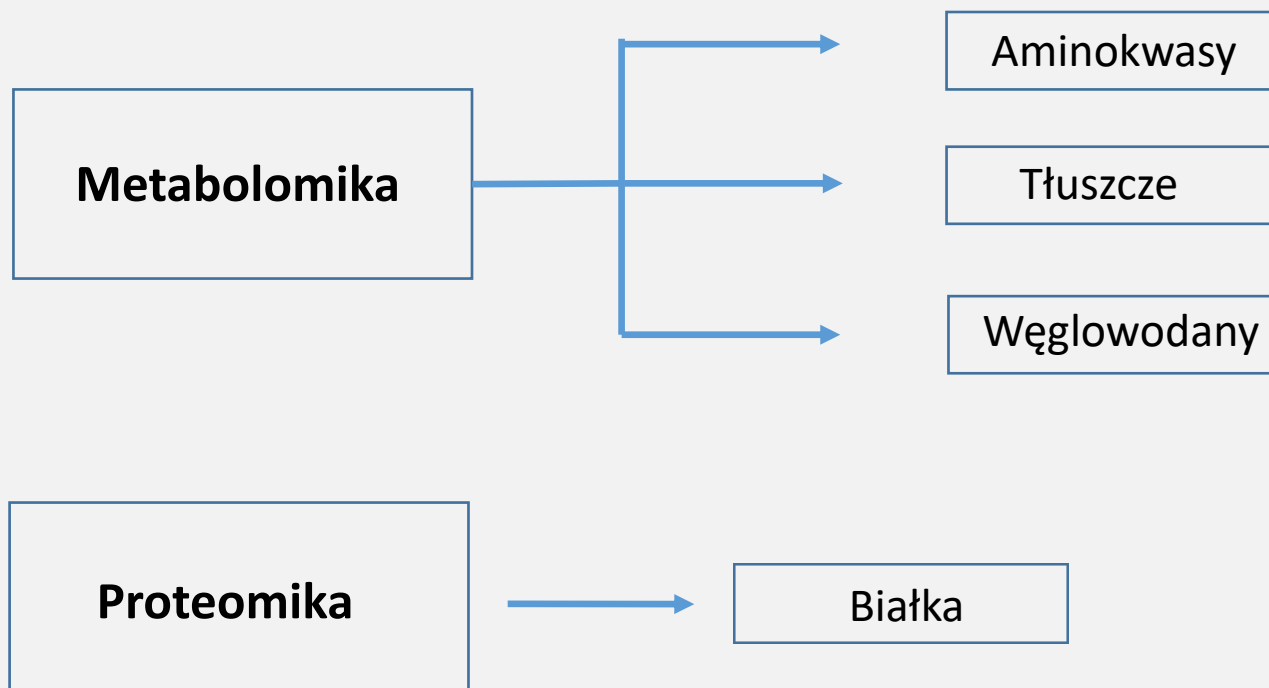
Nowa dziedzina „omika” w tym metabolomika i proteomika jest jedną z najbardziej pręźnie rozwijających się dziedzin nauki.

Staje się użytecznym narzędziem w badaniu różnych patofizjologicznych procesów zachodzących w organizmie.

„Omika” w układach biologicznych



Nowe narzędzia diagnostyczne



Analiza związków drobnocząsteczkowych

- Aminokwasy oznaczane są w osoczu/surowicy, moczu, płynie m-rdzeniowym oraz w suchej kropli krwi.

Analiza aminokwasów

Sucha kropla krwi

Badania przesiewowe noworodków

- PKU
- MSUD
- Cykl mocznikowy
- homocystynuria

Osocze/surowica

Podejrzenie zaburzeń metabolizmu aa

mocz

Podejrzenie zaburzeń metabolizmu aa

- Cystynuria
- LPI
- Kofaktor MoCo

Płyn m-rdzeniowy

Podejrzenie zaburzeń neurometabolizmu

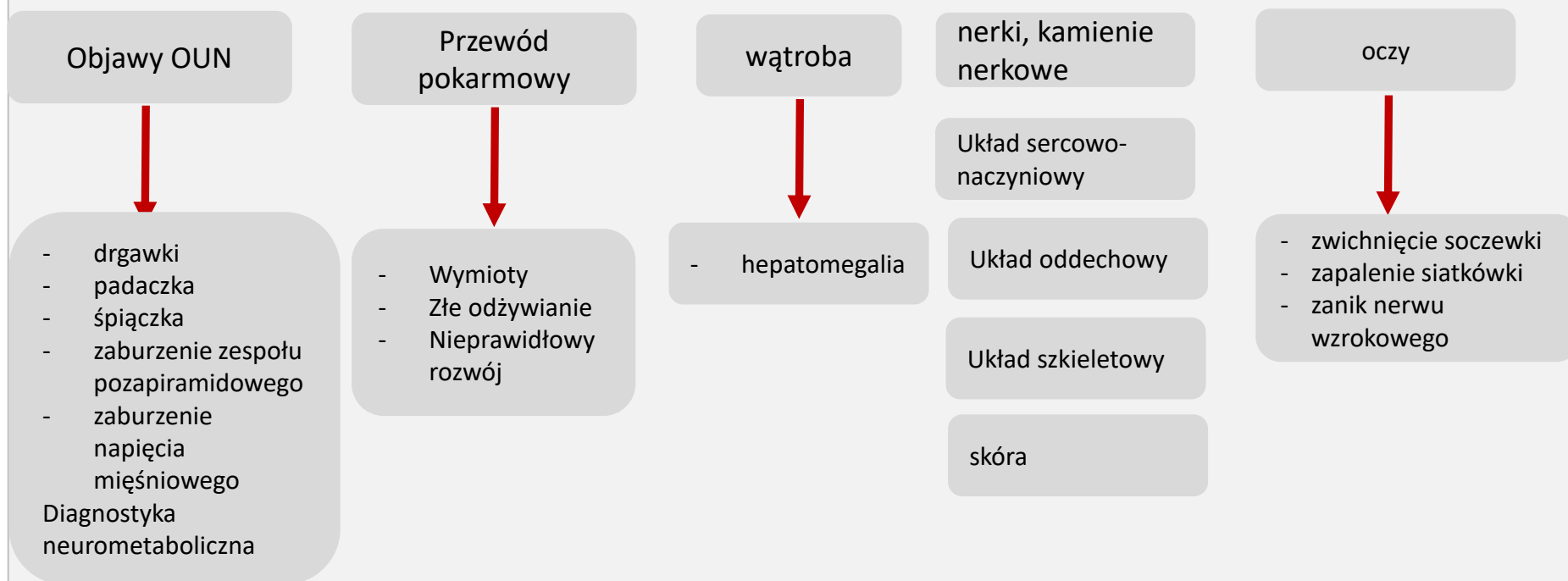
- NKH
- Metabolizm seryny
- Metabolizm glutaminianu



Fenotyp kliniczny w interpretacji zaburzeń metabolizmu

Informacja kliniczna jest niezbędna do prawidłowej interpretacji profilu aminokwasów:

➤ Fenotyp kliniczny podpowiada kierunek diagnostyki metabolicznej



➤ Pozytywny wywiad rodzinny i pozytywny wynik badania przesiewowego noworodków

Czynniki wpływające na interpretację wyniku profilu metabolitów

czas pobrania materiału

wiek pacjenta

hemoliza

**sposób przechowywania i transportu
materiału**

dieta

leki

**Wtórne zaburzenia metabolizmu
aminokwasów:**

1/ galaktozemia

2/ kwasice organiczne

3/ zaburzenia metabolizmu
pirogronianu

4/ dysfunkcja wątroby

5/ niedotlenienie



Fundusze Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita
Polska**



**Instytut
Matki i Dziecka**

Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



pobieranie, przechowywanie, przygotowanie – wpływ na wyniki

Faktor	Materiał	aminokwasy	wartości
Zanieczyszczenie bakteryjne	mocz	Ala, Gly, Pro,	podwyższone
Obecność białka	mocz	Cys	obniżone
Podwyższone erytrocyty	mocz	Orn	podwyższone
Leukocytoza	mocz	Tau	podwyższone
Leukocytoza	krew	Asp, Glu, Tau	podwyższone
Hemoliza	krew	Asp, Glu, Gly, Orn	podwyższone
Hemoliza	krew	Gln, Arg	obniżone
Surowica/plazma	krew	Sur Tau > os Tau Sur Hcy > os Hcy	
Przechowywanie	mocz	Glu, Asp, GABA	podwyższone
Przechowywanie	krew	Gln, Cys, Hcy	obniżone
Trombina	krew	Gly	podwyższone
EDTA	krew	Wpływ na upochadnianie ninhydryną	

METABOLIZM

zespół przemian chemicznych i biochemicznych zachodzących w organizmie, dzięki którym możliwe jest przeżycie każdej komórki

większość reakcji chemicznych zachodzi dzięki energii dostarczanej z pożywieniem
czyli

zachodzące w komórce przemiany węglowodanów , tłuszczu i białek prowadzą do wytwarzania ogromnych ilości energii

Energia ta jest potrzebna do utrzymania temperatury organizmu, aktywności mięśni, wchłaniania i przemian energetycznych, wydzielania gruczołowego oraz potencjałów elektrycznych włókien nerwowych i mięśniowych



METABOLIZM- współzależny system reakcji biochemicznych zachodzących w komórce

Odpowiada na pytania:

- jak komórka pozyskuje energię i siłę redukcyjną ze środowiska zewnętrznego?
- w jaki sposób komórki syntetyzują podstawowe elementy makrocząsteczek?

Główny nośnikiem energii swobodnej jest ATP

ATP – nukleotyd składający się z adeniny, rybozy i trójfosforanu

Jego aktywną formą jest kompleks ATP z jonami Mg^{2+} lub Mn^{2+}

ATP – cząsteczka bogata w energię dzięki obecności jednostki trójfosforanowej zawierającej dwa wiązania fosforanowe

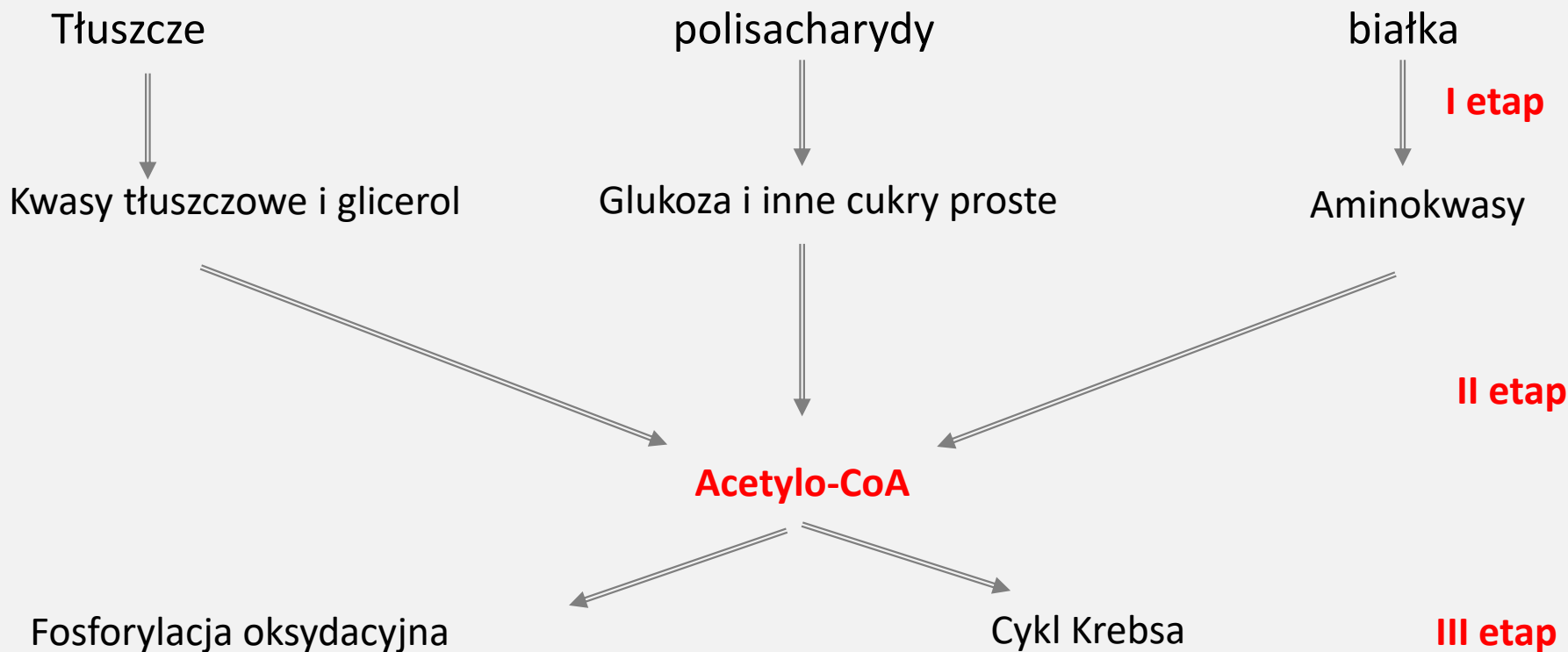
Energia uwalniana jest w trakcie hydrolizy ATP do ADP i ortofosforanu (P_i) lub do AMP i pirofosforanu (PP_i)

Pozyskiwanie ATP

- Spalanie węglowodanów – glikoliza w warunkach tlenowych;
- Spalanie kwasów tłuszczowych – oksydacja kwasów tłuszczowych,
- Spalanie białek – wymaga hydrolizy do aminokwasów oraz ich degradacji do składników cyklu kwasu cytrynowego, a następnie powstanie acetylo-CoA oraz kolejno CO_2 i H_2O .

Pozyskiwanie ATP

Hans Krebs – opisał 3 etapy wytwarzania energii przez utlenianie pożywienia:



Aminokwasy – podstawowe związki w procesach biochemicznych zachodzących w komórce

- są budulcem wszystkich białek,
- część z nich odgrywa istotną rolę jako neuroprzekaźniki lub ich prekursorzy, modulatory,
- są prekursorami hormonów, kofaktorów, puryn i pirymidyn,
- są w większości rozpuszczalne w wodzie, dzięki obecności grupy aminowej i karboksylowej, które w wodzie ulegają jonizacji,
- są filtrowane przez nerki i mogą być łatwo usuwane z moczem w przypadku braku skutecznego mechanizmu reabsorpcji w kanalikach nerkowych,
- istnieje kilka transporterów aminokwasów, których niedobór może przyczynić się do utraty jednego lub kilku aminokwasów z moczem i wystąpienia określonych objawów klinicznych.
- nadmiar aminokwasów jest rozkładany przez określone enzymy, prowadząc do wytwarzania energii i syntezy mocznika z grup azotowych podczas katabolizmu.

Źródłem 20 podstawowych aminokwasów są białka

- Tylko niewielka ilość białka oraz niektóre peptydy są wchłaniane z przewodu pokarmowego.
- Zdecydowana większość białek spożywczych jest trawiona a wchłaniane są tylko ich składniki, czyli aminokwasy.
- Własne białka są nieustannie hydrolizowane do aminokwasów i resyntetyzowane.
- Wymianie takiej podlega w ciągu doby średnio 80 – 100 g białek endogennych i jest ona najbardziej nasilona w błonie śluzowej jelita a najmniej w kolagenie.

Aminokwasy endogenne i aminokwasy egzogenne tworzą wspólną **pulę aminokwasów, która zaspokaja potrzeby organizmu**

Aminokwasy ulegają degradacji tworząc szkielety węglowe, które:

- są wykorzystywane w cyklu Krebsa do wytwarzania energii,
- zbiegają się w siedem związków zdolnych do wejścia bezpośrednio lub pośrednio w cykl Krebsa:
 - pirogronian,
 - acetylo-CoA,
 - acetoacetylo-CoA,
 - α -ketoglutaran,
 - bursztynylo-CoA,
 - fumaran,
 - szczawiooctan.

Aminokwasy ulegające degradacji do acetoacetylCoA, nazywane są ketogennymi i są prekursorami ciał ketonowych (lizyna i leucyna).

Aminokwasy glukogenne po przekształceniu w pirogronian i szczawiooctan mogą syntetyzować glukozę w procesie glukoneogenezy.

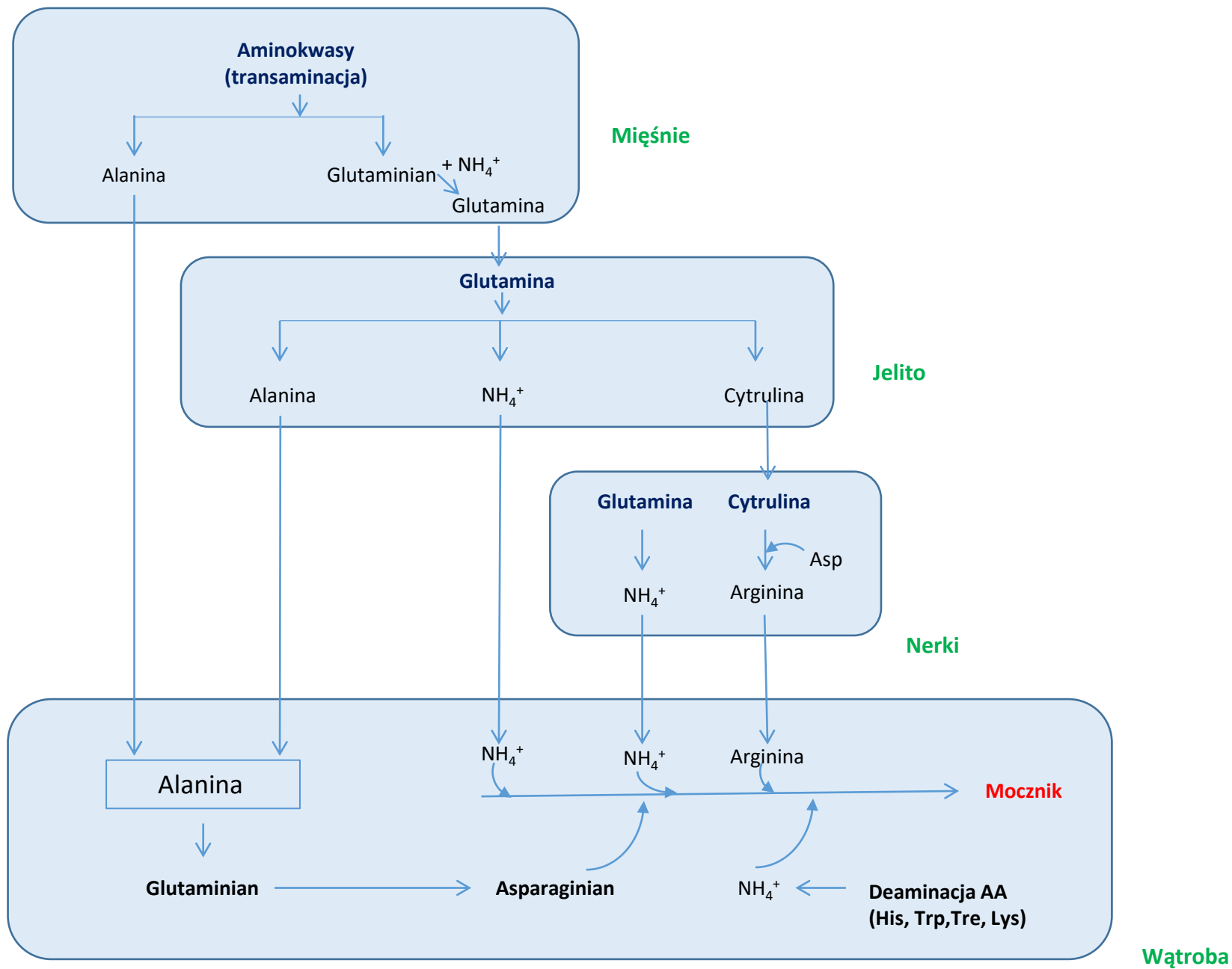
Funkcje metaboliczne aminokwasów

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

Cykl mocznikowy

- rozpad białka powoduje wzrost wolnego azotu w postaci amoniaku, który uszkadza ośrodkowy układ nerwowy,
- w prawidłowo przebiegającym cyklu mocznikowym amoniak przekształcany jest w mocznik i wydalany w moczu,
- reakcje biochemiczne cyklu mocznikowego wykorzystywane są do syntezy i degradacji argininy,
- cykl mocznikowy odpowiedzialny jest za prawidłową homeostazę pH.



Główne enzymy uczestniczące w metabolizmie wolnych jonów amonowych to:

- **syntetaza glutaminowa:** cytozolowy enzym, który katalizuje syntezę glutaminy z glutaminianu i wolnych jonów NH_4^+ w ATP-zależnej reakcji.
- **glutaminaza** enzym mitochondrialny katalizujący reakcję hydrolizy glutaminy do glutaminianu i wolnych jonów NH_4^+
- **asparaginaza** enzym katalizujący przemianę asparaginy do asparaginianu i wolnych jonów NH_4^+
- **dehydrogenaza glutaminianu** enzym mitochondrialny katalizujący reakcje odwracalnej deaminacji oksydacyjnej glutaminianu do α -ketoglutaranu i wolnych jonów amonowych
- **Aminotransferazy,** enzymy uczestniczące w przenoszeniu grup aminowych pomiędzy aminokwasami a ketokwasem bez syntetyzowania lub zużywania wolnych jonów amonowych

Wszystkie wady enzymów cyklu mocznikowego mogą prowadzić do podwyższonego stężenia NH_4^+ **HIPERAMONEMII**

Zwiększone stężenie NH_4^+ prowadzi do niekontrolowanego wzrostu stężenia glutaminy.

Wzrost stężenia NH_4^+ stymuluje syntezę kwasu orotowego

Wzrost kwasu orotowego jest dobrym wskaźnikiem niedoboru argininy

Obniżone stężenie argininy zmniejsza wydajność detoksykacji amoniaku oraz redukcje tlenu azotu

Produkcja kwasu orotowego jest redukowana przez podanie argininy, która stymuluje aktywność cyklu mocznikowego

Cykl mocznikowy

- jeden z wielu przykładów wskazujących na to, że aminokwasy pełnią w naszym organizmie rolę nie tylko budulcową,
- przy braku chociaż jednego aminokwasu, przebieg całego cyklu ulega wyhamowaniu.
- pośrednio, jako kofaktor do produkcji ornityny z glutaminianu o przebiegu cyklu mocznikowego decyduje witamina B₆. Tempo przebiegu cyklu mocznikowego jest dodatnio skorelowane z początkowym stężeniem amoniaku.
- nieprawidłowy przebieg cyklu mocznikowego prowadzi do wzrostu stężenia amoniaku we krwi, co odpowiada za zaburzenia równowagi kwasowo – zasadowej w organizmie, może przyczyniać się do wystąpienia encefalopatii, zaburzeń neurologicznych.

Aminokwasy a karnityna (maślan beta-hydroksy-trimetyloamonu)

Karnityna powstaje z dwóch aminokwasów: metioniny i lizyny.

Karnitynowe estry KT są przenoszone do przestrzeni macierzy przez translokazę.

Następnie estry ulegają hydrolizie, a karnityna odtworzeniu



Homocysteina, metionina, S-adenozylometionina i S-adenozylhomocysteina

Metionina jest:

potrzebna do syntezy białka
donorem grup metylowych
donorem grupy siarkowej
prekursorem dla cystationiny, cysteiny i tauryny

Homocysteina jest:

ściśle związana z metioniną
ważna w metabolizmie kwasu foliowego

Aminokwasy rozgałęzione

- **Leucyna, Isoleucyna i Walina** - aminokwasy niezbędne do syntezy białek oraz innych procesów metabolicznych zachodzących w komórce.
- są głównymi donorami azotu oraz odpowiadają za międzykomórkowy transport azotu.
- Leucyna – ważny aminokwas odżywczy, razem z lizyną jest aminokwasem ketogennym.
- Są dobrym markerem biochemicznym ilości spożywanego białka – szybko reagują na niedobór białka w diecie

Aminokwasy rozgałęzione

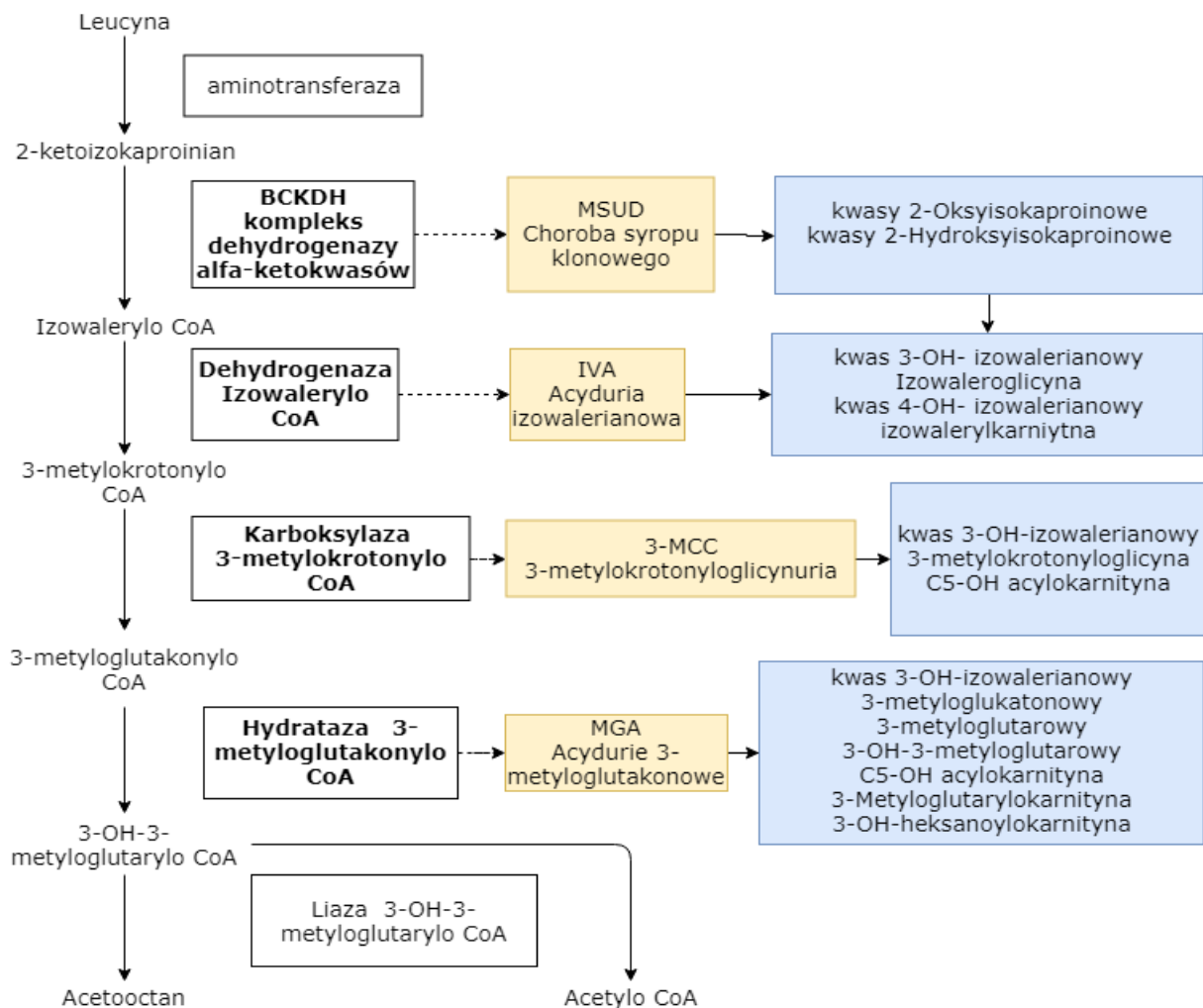
Katabolizm aminokwasów rozgałęzionych jest odpowiedzialny za szereg procesów biochemicznych zachodzących w komórce:

- odwracalna transaminacja Leu, Ile i Val do odpowiednich α -ketokwasów o rozgałęzionym łańcuchu (BCKA): α -ketoizokapronian, α -keto- β -metylowalerianian i α -ketoizowalerian (odpowiednio KIC, KMV i KIV) oraz do syntezy Glutaminianu.
- dekarboksylacja oksydacyjna BCKA do ich odpowiednich pochodnych acylowych CoA o rozgałęzionym łańcuchu.
- Dekarboksylacja oksydacyjna BCKA podlega silnej regulacji, ponieważ szkielet węglowy tych AA nieodwracalnie oddaje azot do Glutaminianu.

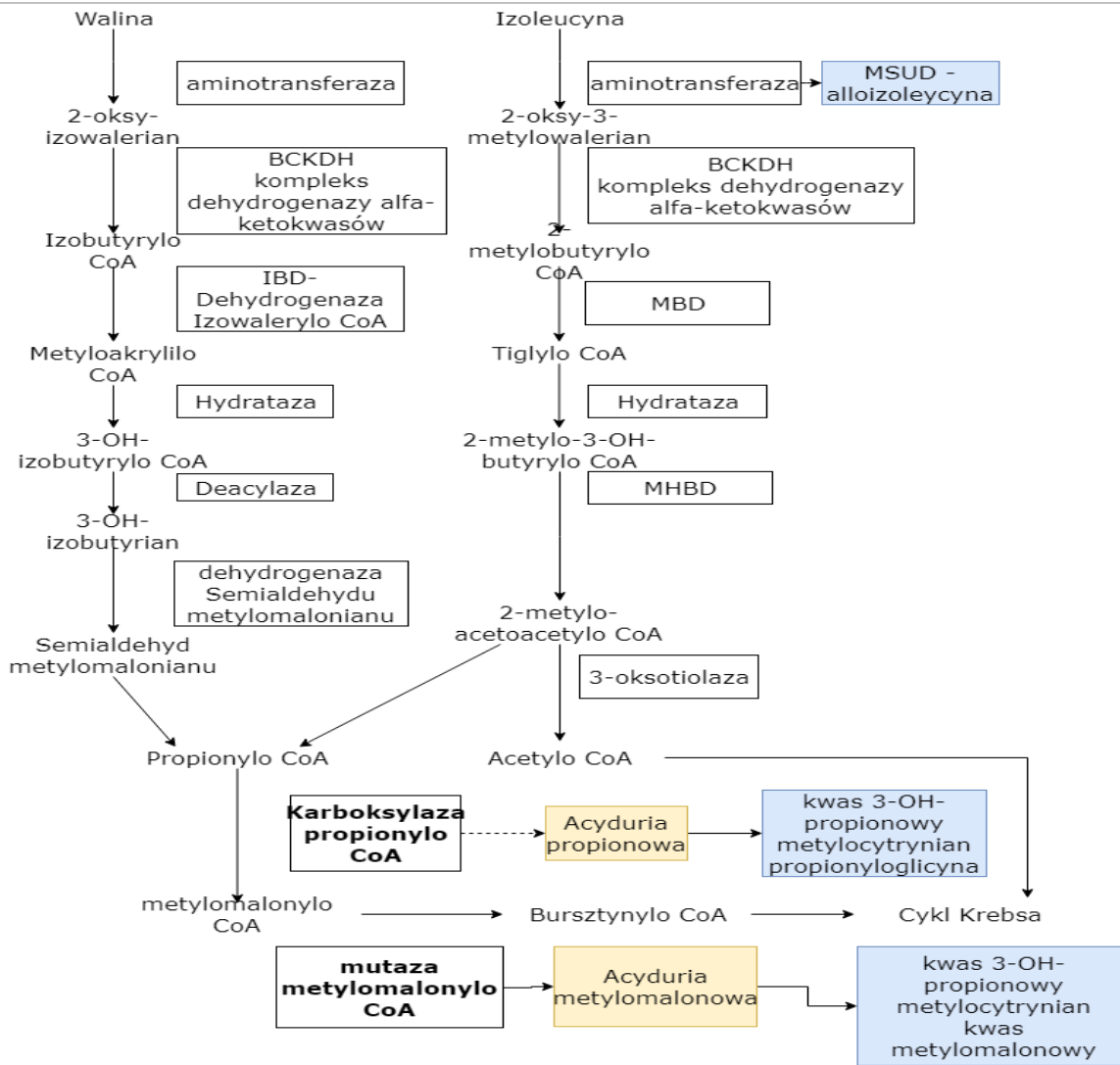
Aminokwasy rozgałęzione a OUN

- Współzawodniczą o miejsca aktywne białek transportowych do ośrodkowego układu nerwowego z innymi aminokwasami, w tym aminokwasami aromatycznymi.
- Wzrost aminokwasów rozgałęzionych ogranicza przedostanie się różnych związków niezbędnych dla OUN, w tym leków z grupy pochodnych dopaminy i serotoniny.
- Aminokwasy rozgałęzione są zależne od aktywnej formy tiaminy będącej głównym kofaktorem w ich przemianach.

Przemiany aminokwasów rozgałęzionych



Przemiany aminokwasów rozgałęzionych



Kwasice organiczne na szlaku przemian aminokwasów rozgałęzionych

IVA - Kwasica izowalerianowa z grupy kwasic organicznych, spowodowana deficytem dehydrogenazy izowalerylo-koenzymu A,

3-MCCC – kwasica 3-metylokrotonyloglicynowa, spowodowana deficytem karboksylazy 3-metylokrotonylo-CoA

MGA I – kwasica 3-metyloglutakonowa, spowodowana zredukowaną aktywnością hydratazy 3-metyloglutakonylo-CoA

HMG-CoA – kwasica 3-hydroksy-3-metyloglutarowa acydemia, spowodowana deficytem liazy HMG-CoA – defekt na szlaku rozpadu leucyny, często objawiająca się niemowlęcą hipoketotyczną hipoglikemią, kwasicą metaboliczną i hiperamonemią (brak ciał ketonowych podczas dekompensacji)



Warunki pobrania materiału do analizy aminokwasów, ich pochodnych i peptydów

Jednym z warunków uzyskania wiarygodnego wyniku,

a tym samym umożliwiającym postawienie właściwej diagnozy i rozpoczęcie leczenia,

jest

prawidłowo pobrany materiał biologiczny!

Materiał wykorzystywany do badań podstawowych:

- sucha kropla krwi pobrana na bibułę
- surowica
- osocze - materiał pobierany na antykoagulant czyli środek przeciwkrzepliwy, dodawany w ściśle określonych proporcjach w stosunku do ilości krwi
- mocz (poranna porcja moczu lub dobowy zbiórka moczu)
- PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy



PROFIL KWASÓW ORGANICZNYCH W MOCZU METODĄ GC-MS

- jedna z głównych metod wykorzystywanych w badaniach „przesiewowych” zaburzeń metabolizmu aminokwasów, wykrywanie kwasów organicznych, zaburzeń beta-oksydacji kwasów tłuszczowych;
- obejmuje ilościowe oznaczanie kwasu orotowego i metylomalonowego
- **Wykrywa niedobór witaminy B12**
- wykrywa nieprawidłowe stężenie uracylu i ukierunkowuje dalszą diagnostykę różnicową w kierunku zaburzeń metabolizmu puryn i pirymidyn;
- **jest pierwszym badaniem mogącym wskazać na zaburzenia metabolizmu amin biogennych lub niedoborów pirydoksyny**
- Jest badaniem „wrażliwym: na stan kliniczny i dietę pacjenta.
- odpowiada na dysfunkcje wątroby, zaburzenia krzepnięcia, cholestazę

Zróznicowany fenotyp kliniczny wymaga szerokiej diagnostyki w kierunku wrodzonych wad metabolizmu

Metabolizm aminokwasów jest podstawowym procesem komórkowym, który odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie organizmu.

Metabolizm aminokwasów ma wpływ na szlak syntezy ATP, metabolizm kwasów tłuszczowych i węglowodanów.

Diagnostyka medyczna w kierunku zaburzeń metabolizmu oparta jest głównie na analizie aminokwasów, ich pochodnych oraz peptydów i białek. Dalsza diagnostyka różnicowa obejmuje węglowodany, kwasy tłuszczowe oraz inne metabolity.





DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ

