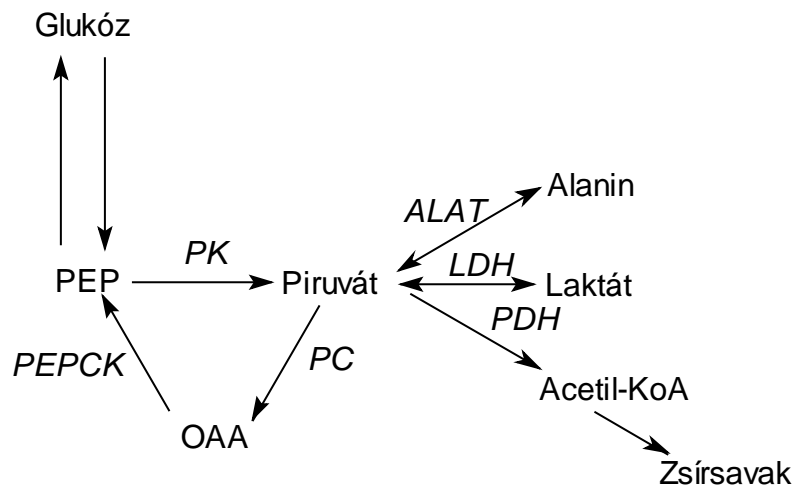


Tejsavas acidózis

I. Háttér információk

Több öröklődő betegség jellemző tünete a metabolikus acidózis, melyben a legfőbb komponens a laktát felszaporodás. A keringésben előforduló tejsav a glukóz anaerob metabolizmusa során keletkezik főként a vörösvértestekben, a bőrben, a vese velőállományában és a harántcsíkolt izomzat fehér rostjaiban. A laktát egy része oxidálódik a vörös izmokban, a szívben, a vese kéregállományában, de a legnagyobb mennyiségben a máj veszi fel és alakítja át glukózzá, vagy oxidálja.

Az egyedüli reakció, amely a metabolizmusban laktát termelődésére vezet, a piruvát NADH_2 -val történő redukciója és a laktát mindig ennek a reakciónak a megfordításával tüntethető el. Ebből következik, hogy minden olyan állapot, amely piroszőlősav felhalmozódásával és a tejsav, valamint a piroszőlősav keringésből való elégtelen eltávolításával jár, tejsavas acidózis kifejlődéséhez vezethet.



1. ábra: A piruvát lehetséges metabolikus útjai. A piruvát foszfoenolpiruváttá (PEP), oxálacetáttá (OAA), acetil koenzim A-vá, alaninná, illetve laktáttá alakulhat. A folyamat enzimei: PK = piruvát kináz, PC = piruvát karboxiláz, PEPCK = foszfoenolpiruvát karboxikináz, ALAT = alanin aminotranszferáz, LDH = laktát dehidrogenáz, PDH = piruvát dehidrogenáz

A piruvát oxidatív metabolizmusa a piruvát dehidrogenáz (PDH) közvetítésével a Krebs ciklusban és a terminális oxidációban történik, míg a piruvát anabolikus felhasználása primeren a piruvát karboxiláz által történhet.

Fiziológiás körülmények között a teljes piruvát mennyiségnek csak kis százaléka transzaminálódik alaninná. Bármely, piruvátot felhasználó reakcióút defektusa a piruvát és laktát akkumulációhoz vezethet. Számos vitaminhiányos állapotban mutattak ki tejsavas acidózist.

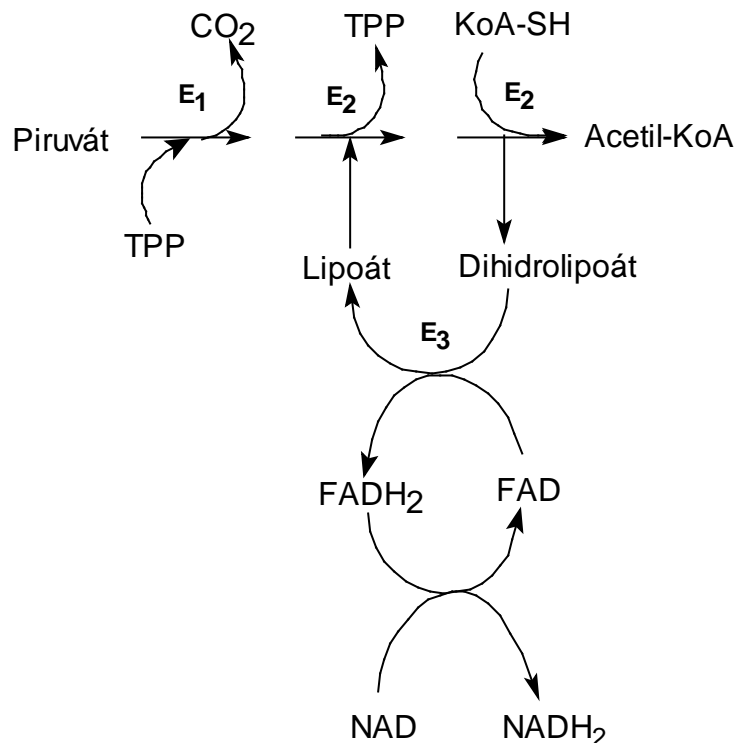
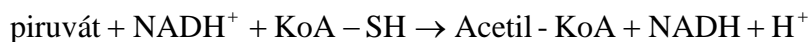
A legközönségesebb, tejsavas acidózishoz vezető állapot a piruvát dehidrogenáz komplex csökkent működése eredményeképpen jön létre. A piruvát dehidrogenáz komplex veleszületett rendellenessége kóros tünetek sokaságával jár együtt. A legkifejezettebb elváltozások az idegrendszerben tapasztalhatók, de fejlődési visszamaradottság és szervi

diszfunkció más szervekben; pl. az izomban és a májban is tapasztalható. Az agy, más szervektől eltérően szokványos körülmények között energiáját majdnem kizárólagosan a glukóz glikolízisben és citrát ciklusban történő eloxidálásából nyeri. Ezen folyamatok blokkolása a piruvát oxidáció, a piruvát dehidrogenáz komplex szintjén az ATP szint csökkenéséhez, az agy és egyéb szervek károsodásához vezet az enzim részleges vagy teljes hiányában szenvedő betegeken.

Jelenleg a PDH hiányra hatékony terápia nem létezik és a gyermekek súlyos PDH hiánnyal legfeljebb két vagy három évig élnek. A kevésbé súlyos PDH hiányos szindrómákban az agyban az acetil-KoA termelődés csökken. Ez az acetilkolin szintézis csökkenéséhez vezet, ami egyik lehetséges lehet az enyhe PDH deficienciában észlelhető mozgáskoordináció csökkenésnek.

II. A PDH komplex defektusa

A PDH multienzim komplex, ami három különböző E₁, E₂ és E₃ enzimből áll, és öt különböző koenzimet igényel. A PDH által katalizált reakció:



2. ábra: A piruvát dehidrogenáz komplex működése. E₁ = piruvát dekarboxiláz, E₂ = dihidrolipoil transzacetiláz, E₃ = dihidrolipoil dehidrogenáz, TPP = tiamin pirofoszfát

A piruvát dehidrogenáz komplex elégtelensége az E₁ rész (piruvát dekarboxiláz) deficienciájából, az E₃ rész (dihidrolipoil dehidrogenáz) hiányából, vagy egyik- másik a

PDH-ban koenzimként, vagy kofaktorként szereplő vitamin szerzett hiányából adódhat. Az E₃ (dihidrolipoát dehidrogenáz) az α-ketoglutarát dehidrogenáznak, az elágazó szénláncú ketosav dehidrogenáznak, és a glicin hasítását végző enzimnek is komponense. Azok a csecsemők, akiknek hiányzik a dihidrolipoát dehidrogenázuk, ritkán érik meg a több hónapos kort. Börbiopsziás anyagból nyert és szövettanyészetben fenntartott fibroblasztok kiválóan alkalmasak PDH deficienciára gyanús betegeken a diagnózis felállítására.

Esetismertetés

9 hónapos terhesség végén 2,9 kg-os fiúgyermek született szövődmenymentes szüléssel. Újszülöttként súlygyarapodása megállt hányással, metabolikus acidózissal járó periódusok többször előfordultak. 8 hónapos korában renális tubuláris acidózis diagnózist állítottak fel. Az akkor elvégzett fizikális vizsgálatok szerint a gyermek fizikálisan alulfejlett 4,1 kg súlyú, hipotóniás, kis izomtömegű, mozgás-koordinációja rossz. A feji régió computertomográfiája az agykéreg atrophiját mutatta. A látó és hallóideg súlyos atrophijája is kimutatható volt.

A laboratóriumi leletek perzisztáló acidózist; pH 7,0-tól 7,2-ig 9,0 mM-os vér laktát koncentrációval (normálérték 2,2 mM), 2,4 mM piruvát koncentrációval (normál 0,7 mM) és 1,4 mM-os alanin koncentrációt (normál 0,09-0,31 mM) mutattak.

Az állapotot tiaminnal 600 mg/nap és biotinnal 10 mg/nap kezeléssel próbálták meg rendezni négy héten át, de ez nem befolyásolta sem a klinikai állapotot, sem a vér laktát illetve piruvát szintjét. A szérumbikarbonát szint 20 mM alatt volt (normál 25-26 mM) és ott is maradt a napi 4,9 g orális nátriumbikarbonát kezelés ellenére. A vizeletminták gázkromatográfiás, tömeg spektrometriás vizsgálata kimutatta a tejsav, α-hidroxi vajsav, β-hidroxi valeriánsav és α-ketoglutársav felszaporodását. Ezek a vegyületek a normál vizeletnek nem összetevői.

Fibroblaszt kivonatok piruvát dehidrogenáz komplex, α-ketoglutarát dehidrogenáz és lipoamid dehidrogenáz aktivitását vizsgálták. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja.

	PDH-K	α-KGDH-K (μmol/min/mg protein)	LAD	LAD K _M (mM lipoamide)
Normál (n=20)	200 ± 25	109 ± 11	62 ± 7	1.41 ± 0.10
Beteg kontrol* (n=26)	156 ± 17	107 ± 9	59 ± 4	1.64 ± 0.37
Ataxia ⁺ (n=17)	139 ± 21	104 ± 10	52 ± 4	1.51 ± 0.15
Laktacidózis ^x (n=39)	134 ± 13	81 ± 6	50 ± 6	2.3; 1.6; 1.3
Összes kontroll (n=102)	154 ± 9	97 ± 5	56 ± 2	1.55 ± 0.11
Beteg (4x mérve)	58.9 ± 27	19.8 ± 2	12.4 ± 1.9	1.29 ± 0.29

* betegek ataxia vagy laktacidózis nélkül

⁺ betegek Friedrich ataxiával

^x betegek laktacidózissal, de normál LAD aktivitással

1. számú táblázat: Fibroblaszt kivonatok piruvát dehidrogenáz komplex (PDH-K), α-ketoglutarát dehidrogenáz (α-KGDH-K) és lipoamid dehidrogenáz (LAD) aktivitásai.

A K_M és a V_{max} dihidrolipoil dehidrogenázban mért értékeit a 2. táblázat mutatja.

	Lipoamid (mM)	NAD (μ M)	Lipoamid- H_2 (mM)	NADH ₂ (μ M)
Kontroll K_M	1.75	201.00	1.00	56.00
Beteg K_M	1.30	382.00	1.17	83.00
Kontroll V_{Max}	44.50	34.50	36.00	52.00
Beteg V_{Max}	12.50	14.00	16.00	20.00

2. táblázat: Lipoamid dehidrogenáz bőr fibroblaszt tenyészetben mért látszólagos K_M és V_{Max} értékei

A fehérjebevitel kismértékű megszorítása (2 g/kg/nap) nem tudta enyhíteni a tejsavas acidózist. A szénhidrát bevitel, ha a teljes kalória bevitel 40 %-ára csökkentették az acidózis rosszabbodott, a szénhidrát megszorítás kéthetes periódusa alatt. A hozzátartozók beleegyezésével orális liponsav terápiát kezdtek. (25-50 mg/testsúly kg/nap). A kezelés hatására a tejsavas és piroszölősavas acidózis nagymértékben javult. A fenti terápia a vizeletben megtalálható abnormális szerves savak ürítését is megszüntette. Fenntartó kezelésként 50 mg/kg/nap liponsav adását és 2-2 5 g fehérje/kg/nap diétás bevitelét folytatták két évig, mellékhatások nélkül. Acidózis nem jelentkezett, kivéve azokat az eseteket, amikor a kezelést fertőzések miatt félbeszakították. A beteg kismértékű, de állandó súlygyarapodást mutatott, 30 hónapos korában testsúlya 9 kg volt és motoros fejlődése számottevően javult.

Kérdések

1. Miért volt a piruvát, laktát és alanin koncentráció abnormálisan magas a betegnél?
2. A PDC komplex, az α -KGDH komplex és a dihidrolipoát dehidrogenáz enzim aktivitások a beteg fibroblasztjaiban mind alacsonyabbak voltak, mint az egészségesekben. Magyarozza meg, hogyan vezethet egy enzimet kódoló gén mutációja ezekhez az effektusokhoz?
3. Ha liponsavat fibroblaszt homogenizátumokhoz adtak, a hozzáadás nem növelte a dihidrolipoát dehidrogenáz aktivitását, ennek ellenére az in vivo liponsav kezelés drámai hatást mutatott. Magyarozza meg a jelenséget!
4. Milyen okoskodás állhat a fenti terápiás próbálkozások háttérében: tiamin, biotin bikarbonát és fehérje megszorítás?
5. A diétás szénhidrátbevitelnek a teljes kalória fogyasztás 40 %-ára való visszaszorítása hatékony terápiának bizonyult azon paciensekben, akiknél a tejsavas acidózis a piruvát dehidrogenáz komplex E_1 alegysége genetikai hiányával volt magyarázható. Adjon magyarázatot arra a megfigyelésre, hogy a mi esetünkben említett betegnél a diétás szénhidrát megszorítás miért eredményezte az acidózis rosszabbodását?
6. Adjon biokémiai magyarázatot a vér bikarbonát koncentrációjának alacsony értékére.
7. A dikloracetát, a piruvát dehidrogenáz kináz inhibitora, bizonyos tejsavas acidotikus kórképekben hasznos terápiás eszköznek bizonyult. Mít gondol, mely enzim defektusa kezelhető ezzel a terápiával és miért?
8. Írja le a mechanizmusokat, melyek által a PDC aktivitása szabályozott. a) allosztérikusan, b) kovalens módosítással.
9. Az alább felsorolt metabolitok koncentrációjának csökkentése hogyan befolyásolja a citrátkör sebességét? a: ATP, b: acetil-koenzim A, c: NADH₂? Hogyan befolyásolják ezek a változások a glikolízist, glukoneogenezist?

Irodalom

Brown et al. *The clinical and biochemical spectrum of human pyruvate dehydrogenase complex deficiency.* **Annals New York Academy of Sciences** 1989; 573:360-368

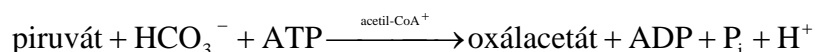
Ho L. et al. *Genetic defects in human pyruvate dehydrogenase* **Annals New York Academy of Sciences** 1989; 573:347-359

Kwan-Fu Rex Sheu et al. *Abnormalities of pyruvate dehydrogenase complex in brain disease* **Annals New York Academy of Sciences** 1989; 573:378-391

Matalon R. et al. *Lipoamide dehydrogenase deficiency with primary lactic acidosis: Favorable response to treatment with oral lipoic acid* **J. Pediatr.**, 1984; 164:65-69

III. Piruvát karboxiláz hiány

A piruvát karboxiláz (PC) mitokondriális enzim, amely négy egyforma alegységből áll. Minden alegységen kötőhelyek találhatók a szubsztrátok, úgymint piruvát, ATP, bikarbonát és az allosztérikus effektor, acetyl-KoA számára. Minden alegység kötőhelyet tartalmaz egy molekula kovalensen kapcsolt biotin számára is. A piruvát karboxiláz reakcióját az alábbi egyenlet mutatja.



A piruvát karboxiláz aktivitása majdnem teljesen az allosztérikus aktivátor, az acetyl koenzim-A jelenlététől függ. A piruvát karboxiláz által katalizált reakció a glukoneogenezis első lépése, és zsírsavak mobilizálása illetve acetyl-KoA képződésével együtt járó állapotokban aktiválódik. Az enzim legnagyobb aktivitást azon szövetekben mutat, ahol glukoneogenezis történik (máj és vese), de jelen van minden mitokondriumot tartalmazó szövetben. Mind az agy, mind a zsírszövet nagy koncentrációban tartalmazza az enzimet, amely anaplerotikus szerepet játszik és fontos a zsírsav szintézis, így a membránok szintézise szempontjából. A piruvát karboxiláz az izomban is szereppel bír, ahol is a foszfoenolpiruvát karboxikináz (PEPCK) enzimmel együtt a citrátkör intermedierek koncentrációját szabályozza.

A piruvát karboxiláz hiánya a klinikai és biokémiai manifesztáció szempontjából két csoportra osztható. A betegség egyszerű formájában ('a' forma) a beteg az élet első hónapjaiban közepesen súlyos acidózisban szenved és fejlődésében elmarad. A betegség súlyosabb formája ('b' forma) hamarosan a megszületés után súlyos tejsavas acidózissal kezdődik, amelyet hepatomegália, emelkedett vér ammónia, citrullin és lizin koncentráció kísér. A 'b' formában szenvedő betegek ritkán élik túl a 3 hónapos kort. A két forma összehasonlító jellemzőit a 3. táblázat mutatja.

	Group 'A' [n = 13]	Group 'B' [n = 11]
Origin	8 American indian, 1 Canadian Italian parents, 3 U.S. Caucasian, 1 Japanese	1 Canadian (1 with Egyptians Parents) 4 French, 2 U.K., 1 West German, 1 Saudi Arabian, 1 Swede
Presentation	Metabolic acidosis Delayed neurologic development	Metabolic acidosis Hepatomegaly
Age of presentation	Birth of 5 month	Neonatal
Survival	2 survive to 5 years; severe mental retardation	All dead in 3 month
Biochemical	α -ketoglutarate in urine Lactic acidosis mild with severe attacks on infection	α -ketoglutarate in urine Lactic acidosis chronically severe
Pyruvate carboxylase activity	< 5 % control	< 5 % control
Lactate / pyruvate ratio	Normal	Elevated (XS)
Acetoacetate / 3HOB ratio	Normal?	Elevated (XS)
Blood ammonia	Normal	Elevated (XS)
Alanine	Elevated	Elevated
Citrulline	Normal	Elevated (XS)
Lysine	Normal	Elevated
Proline	Elevated	Elevated
PC [³ H]biotin protein (125 kDa)	Present	Absent in 6/10 cases
PC immunoreactive Protein	Present	Absent in 6/10 cases
PC mRNA	Present	Absent in 4/10 cases
	Refs. 85 to 92 +3 unpublished cases*	Refs. 93 to 98 +3 unpublished cases*

3. táblázat: A piruvát karboxiláz (PC) hiány megjelenési formái és következménye

Az 'a' formában szenvedő betegekben piruvát karboxiláz aktivitás még kimutatható, ezzel szemben a 'b' formában piruvát karboxiláz aktivitás nem mérhető. Néhány vizsgált paciensenél mind a fehérje, mind a szintéziséért felelős messenger RNS hiányzott.

Az 'a' formában szenvedő paciensek közül a túlélők súlyos szellemi visszamaradottságban szenvednek. A szellemi visszamaradottság feltételezhető oka az agyi neuronok pusztulása, annak ellenére, hogy normál körülmények között piruvát karboxiláz enzim aktivitás nem a neuronokban, hanem az asztrocitákban található. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a piruvát karboxiláz elengedhetetlen anaplerotikus szereppel bír az asztrocitákban és hiányában a neuron meg van fosztva olyan, létezése számára elengedhetetlen tápanyagoktól, amelyeket normálisan az asztrocitáktól kapna. A jelenlegi kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a neurotranszmitter raktárak részben a preszinaptikus terminálokban történő de novo szintézissel töltődnek fel részben pedig a neuronok az asztrocitákból származó glutamint használják fel mind a glutaminsav, mind a γ -aminovajsav (GABA) szintézisére

A piruvát karboxiláz hiányára a metabolikus acidózisból és a vér magas tejsav koncentrációjából következtethetünk. Ezek azonban közvetett bizonyítékok. Végleges diagnózis a piruvát karboxiláz aktivitásának direkt kimutatásán alapul, bőrből tenyésztett fibroblasztokban. Olyan fibroblasztokban, amelyekben az enzim aktivitás csökkent, vagy nem mutatható ki, kívánatos megbizonyosodni arról, hogy az enzim fehérje kimutatható-e. A piruvát karboxiláz fehérje fibroblasztokból való kimutatására két technikát, a tricilált biotin jelzést és az S-metioninnal jelzett fehérje immun precipitációját használják. Az első technikánál a sejteket biotin hiányos táptalajon tartják, majd magas specifikus aktivitású jelzett biotinnal inkubálják együtt. A fehérjéket nátrium-laurilszulfát gélelektroforézissel (SDS-PAGE) választják szét. A szárított gélek fluorometriás vizsgálatánál három csík látható. Az első csík M = 125000, a piruvát karboxiláz polipeptidjét jelöli, a második M = 75000 a β -

metil-krotonil-koenzim-A karboxilázét, a harmadik az $M = 73000$, a propionil-koenzim-A-karboxilázét ($M =$ molekulatömeg D-ban kifejezve).

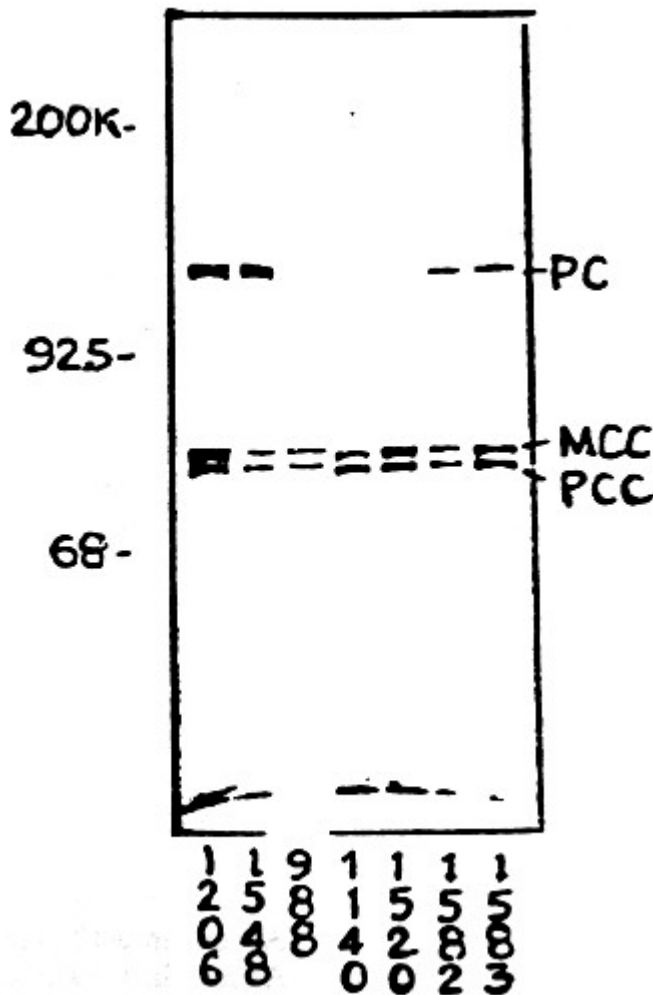


FIGURE 3. [^3H]biotin labeling of carboxylase proteins in cultured skin fibroblasts. SDS/PAGE electrophoresis was carried out on amniocyte or skin fibroblast extracts after labeling with [^3H]biotin, followed by fluorography of the dried gel. Cell strains used were lane 1: control cell strain 1206; lane 2: control cell strain 1568; lane 3: PC-deficient cell strain 988 (presentation I); lane 4: PC-deficient cell strain 1140 (presentation II); lane 5: PC-deficient cell strain 1520 (presentation II); lane 6: cell strain 1582 (mother of 1520); lane 7: cell strain 1583 (father of 1520).

3. ábra. Egy tipikus elektroforetikus kép. A **PC** = piruvát karboxiláz, **MCC** = β -metil-krotonil-koenzim-A karboxiláz, **PCC** = propionil-koenzim A karboxiláz pozíciója a gélen.

Fentiekkel azonos eredmények nyerhetők olyan fibroblaszt extraktumokkal, amelyek [^{35}S]-metionin jelenlétében nőttek. Ezekben az esetekben radioaktívan jelzett piruvát karboxilázt anti-PC-antiszérummal immunprecipitálták és SDS-PAGE gélelektroforézissel vizsgálták. Ez a kísérlet mutatta, hogy a biotin jelzéssel ki nem mutatható piruvát karboxiláz fehérje az 1140-el és az 1520-al jelzett (3. ábra) sejtvonalakban az immunreaktív fehérje hiányának tulajdonítható, és nem a karboxiláz defektív biotinilációjának következménye.

Fent leírtakhoz hasonló kísérleteket végeztek abból a célból, hogy összefüggést keressenek a betegség klinikai megjelenési formái és a biokémiai léziók között. Az 'a' típusban sorolható betegek rendszerint CRM pozitívak, azaz a piruvát karboxiláznak megfelelő immunreaktív fehérje (cross reacting material, CRM) mutatható ki bennük, míg a súlyosabb klinikai tünetekkel járó esetekben fehérjét nem találtak. Ezek az egyének vagy olyan fehérjéket szintetizálnak, amelyek sem nem biotinilálódnak, sem nem csaphatók ki anti-PC antitesttel, vagy egy másik lehetséges magyarázat szerint egyáltalán nem szintetizálnak PC fehérjét.

A CRM - negatív piruvát karboxiláz deficienciának súlyos metabolikus következményei vannak. Valószínűsíthető, hogy a beteg személyekben az intracelluláris aszpartát igen-igen hiányzik. Ha a piruvát karboxiláz hiányzik az érintett személyek az oxálacetáthoz a táplálékkal bevitt aszpartátból, glutamátból, vagy glutaminból jutnak hozzá, ami a fenti hármasz esszenciális aminosavakká teszik. A CRM negatív személyek aszpartát és oxálacetát hiánya tükröződhet 1) az urea ciklus deficienciájában, 2) a mitokondriális és citoplazmatikus redox állapot megváltozásában, 3) a lizin defektív metabolizmusában.

II. Esetismertetés

Három hónapos leány gyermek fejlődése zavartalan volt, mielőtt a görcsrohamok megjelentek volna. A csecsemő állapota gyorsan romlott, hipotóniás lett, pszichomotoros fejlődése lelassult. A piruvát és laktát plazmakoncentrációi a normálist hétszeresen meghaladták. A plazma alanin koncentrációja is magasabb volt és alanin bevitelére a normális glukoneogenetikus válasz elmaradt. Fibroblasztokból létrehozott szövettényészen a piruvát karboxiláz aktivitását mérték és a normális 1 %-ánál is kevesebbnek találták.

Kérdések – a piruvát karboxiláz esettanulmányhoz

1. Mi a piruvát karboxiláz metabolikus jelentősége?
 2. Hogy mérne piruvát karboxiláz aktivitást egy fibroblaszt kivonatból?
 3. A 'b' típusú betegségben szenvedők redoxállapota is eltérést mutat a normálistól, amennyiben a citoszólt inkább az oxidált állapot jellemzi, amit a normálisnál magasabb acetecetsav / β -hidroxi vajsav hányados is jellemez. Adjon biokémiai magyarázatot a fenti megfigyelésre.*
 4. Magyarázza meg, hogy alanin adagolásával miért nem lehetett glukoneogenezist indukálni a betegben?
 5. Magyarázza meg, hogy a szövettényésztő médiumhoz adott glutamin miért serkentette a beteg fibroblasztjainak növekedését?
 6. Milyen kezelést ajánlana betegének? Véleményét magyarázza meg!
 7. A legtöbb PC hiányos paciens nagyon korán meghal, és a túlélők is szellemileg károsodtak. Milyen biokémiai módszereket használna fel a genetikai tanácsadáson?
 8. Miért károsodik az urea ciklus a PC deficienciában?
 9. Mi az a biotinidáz? Milyen hatása lenne a biotinidáz defektusának a PC aktivitására?*
 10. Mit jelent az alábbi állítás? A PC anaplerotikus szerepet játszik a zsírsav bioszintézisében, vagy a PC anaplerotikus szerepet játszik az agyi metabolizmusban.
 11. Mi az értelme az enzimaktivitás meghatározásnak a máj, vese és agyszövetben? Milyen funkciókhoz szükséges a piruvát karboxiláz az itt felsorolt szövetekben?
 12. Miért vezet a piruvát karboxiláz károsodása agyi károsodáshoz?
- * A megjelölt kérdések értelmezésére későbbi konzultációk során kerül sor.