

PTERIDINI – METABOLIČKE FUNKCIJE I KLINIČKI POREMEĆAJI

Gordana Bjelaković*, Saša Živić**, Tatjana Jevtović*, Ivana Stojanović*, Bojko Bjelaković**, Jelenka Nikolić*, Dušica Pavlović* i Gordana Kocić*

Pteridini jesu široko rasprostranjena jedinjenja u prirodi za koja su vezane brojne značajne fiziološke funkcije. BH₄ klasifikuje se kao nekonjugovani pteridin da bi se razlikovao od folne kiseline i njenih metabolita, folata koji čine grupu konjugovanih pteridina. Za razliku od folne kiseline, koja je vitamin, BH₄ može da se sintetise u organizmu.

Tetrahydrobiopterin (BH₄) kofaktor je bitan za razne biološke procese i prisutan je verovatno u svim ćelijama i tkivima viših organizama. Prisustvo perzistentne hiperfenilalaninemije sa atipičnim neurološkim simptomima kod dece koja ne reaguje na režim ishrane siromašne u fenilalaninu, a koja nestaje aplikacijom BH₄ dalo je snažan impuls u izučavanju metaboličkih funkcija ovog nekonjugovanog pteridina.

BH₄ jeste prirodni kofaktor hidrosilaza cikličnih amino kiselina - fenilalanin hidrosilaze (EC 1.14.16.2), tirozin-3-hidrosilaze (EC 1.14.16.3) i triptofan-5-hidrosilaze (EC 1.14.16.4) kao i sva tri izoenzima azot oksid sintaze (NOS). Potreban je za aktivnost gliceriletar-monooksigenaze (1.14.16.5). Regeneracija tetrahydrobiopterina je neophodna za održavanje katalitičke aktivnosti ovih enzima.

Insuficijencija BH₄ remeti funkciju hidrosilaza pomenutih cikličnih amina a time se remeti i sinteza njihovih produkata, naročito 5-hidroksitriptofana, prekursora serotonina, i L-dopa (prekursora kateholamina). Ovi metaboliti funkcionišu kao neurotransmiteri u mozgu, i njihov deficit uzrokuje oboljenja CNS (uključujući usporen psihomotorni razvoj, disfunkciju bazalnih ganglija i nestabilnost telesne temperature. Sve količine tetrahydrobiopterina prisutnog u organizmu potiču od *de novo* biosinteze ovog jedinjenja.

Deficit tetrahydrobiopterina remeti funkciju sva tri izoenzima azot oksid sintetaze (NOS): (NOS-I) ili neuronalna, makrofagalna ili inducibilna (NOS-II) i endotelijalna (NOS-III) zbog čega dolazi do smanjene produkcije NO i povećane produkcije superoksida. Inhibicija GTP ciklohidrolaze 1 (GCH 1), ključnog enzima u biosintezi tetrahydrobiopterina, koji koristi kao supstrat isključivo GTP bez magnezijuma (Mg-free GTP) smanjuje vazodilataciju i uslovljava povećanje krvnog pritiska.

Tetrahydrobiopterin je neophodan u prevenciji oštećenja krvnih sudova i normalnog funkcionisanja endotelijalnih ćelija kod dijabetesa. BH₄ reguliše normalnu proliferaciju endotelijalnih ćelija (EC) koje proizvode NO dejstvom NOS-III. Rezultat smanjene produkcije azot monoksida (NO) od strane endotelijalnih ćelija kod dijabetesa jeste poremećena angiogeneza koja direktno zavisi od nivoa BH₄ kao kofaktora endotelijalne azot oksid sintaze.

Veoma interesantna činjenica jeste da se ovaj kofaktor sintetise iz GTP nukleozid trifosfata koji je takođe neophodan za sintezu proteina, kao i za funkcionisanje adenil ciklaznog sistema, kojim se proizvodi ciklični AMP, sekundarni glasnik potreban za ispoljavanje adrenalina, glukagona i drugih hormona.

Stimulacija biosinteze tetrahydrobiopterina citokinima nesumnjivo ukazuje na biološke funkcije ovog pteridina u imunom odgovoru organizma.

Tkivna distribucija BH₄ ukazuje na podatak da je bubrežno tkivo najbogatije ovim metabolitom u odnosu na moždano i jetrino tkivo; to ukazuje na potrebu za izučavanjem fizioloških funkcija BH₄ u bubregu.

Važnost BH₄ u produkciji tirozina, neophodnog u sintezi hormona tiroideje (T₃ i T₄), u produkciji neurotransmitera - DOPA, dopamina, noradrenalina, serotonina, melatonina, u funkcionisanju endotelijalnih ćelija produkcijom azot monoksida (NO), obezbeđenju normalne angiogeneze, održavanju normalnog krvnog pritiska ukazuje na dalje pravce izučavanja bioloških funkcija ovog veoma značajnog kofaktora intermedijernog metabolizma. *Acta Medica Mediana* 2004; 43(2): 59-64.

Ključne reči: pteridini, tetrahydro bioterin, BH₄, metabolizam, klinički poremećaji

Biohemijski institut Medicinskog fakulteta u Nišu*
Dečja intema klinika Kliničkog centra u Nišu**

Kontakt: Gordana Bjelaković
Biohemijski institut Medicinskog fakulteta
Bulevar Dr Zorana Đinđića 81, 18000 Niš, Srbija i Crna Gora

Uvod

Pteridini jesu široko rasprostranjena jedinjenja u prirodi pri čemu postoje dve grupe – konjugovani pteridini, gde spada folna kiselina i njeni derivati, i ne-

konjugovani pteridini čiji je predstavnik tetrahidrobiopterin (BH_4) (1). Folati se nazivaju konjugovani pteridini jer je njihov pteridinski prsten povezan sa para-aminobenzoil -glutamatom supstitucijom u poziciji 6 pteridinskog prstena.

Kod ljudi, tetrahidrobiopterin (BH_4), najznačajniji nekonjugovani pteridin (pterin), razlikuje se po *de novo* biosintezi, suprotno folnoj kiselini kao vitaminu. Veoma interesantna činjenica jeste da se ovaj kofaktor sintetiše iz GTP-a, nukleozid trifosfata koji je takođe neophodan za sintezu proteina, kao i za funkcionisanje G_s i G_i i proteina koji funkcionišu u sklopu adenil ciklaznog sistema, kojim se proizvodi ciklični AMP, sekundarni glasnik potreban za ispoljavanje dejstava nekih hidrosolubilnih hormona kao što je adrenalin, glukagon i drugi.

Izučavanje ovih jedinjenja dugo vremena je bilo skoncentrisano na upoznavanju biohemijskih funkcija folne kiseline i njenih konjugata, jedinjenja koja imaju ključnu ulogu u sintezi nukleinskih kiselina, RNA i DNA i sintezi proteina.

Folna kiselina pripada grupi hidrosolubilnih vitamina. Jetra je glavni depo folne kiseline. Posle resorpcije i ulaska u ćelije folna kiselina se redukuje, najpre dejstvom folat reduktaze, a zatim dihidrofolat reduktaze prelazeći u tetrahidrofolnu kiselinu (THF), aktivni oblik folne kiseline koji se javlja u metaboličkim reakcijama u obliku koenzima metil-THF i metilen-THF. Utvrđeno je da je metil-THF glavna forma folata u krvnoj plazmi dok je metilen-THF prisutan u visokim koncentracijama intracelularno i predstavlja privremenu rezervnu formu folne kiseline. Oba koenzima, metil-THF kao i metilen-THF igraju ključnu ulogu u sintezi brojnih značajnih ćelijskih jedinjenja, obezbeđujući proces metilisanja značajan za sintezu RNA i DNA (2). Zbog visoke metaboličke aktivnosti mladih eritropoetskih ćelija u sintezi proteina, specijalno hemoglobina, sazrevanje eritrocita zahteva, pored brojnih faktora hematopoeze, adekvatno unošenje folne kiseline i kobalamina, vitamina B_{12} sa hranom, prvenstveno zelenim lisnatim povrćem, i mesom (3). Stoga u slučaju nedostatka bilo folne kiseline, bilo vitamina B_{12} dolazi do diseritropoeze i pojave makrocitne, megaloblastne anemije (3). Jedna od primarnih funkcija folne kiseline je regeneracija metionina iz homocisteina. Za funkcionisanje ovog ciklusa neophodan je vitamin B_{12} , kobalamin. Sam metionin, u svom aktivnom obliku kao S-adenozil-metionin koristi se kao ključni donator metil grupe pri sintezi kreatina, adrenalina, holina, melanina; dekarboksilisani S-adenozil metionin uključen je u sintezu poliamina, spermidina i spermata, vitalnih konstituenata ćelija sisara (4).

Tetrahidrobiopterin (BH_4), predstavnik nekonjugovanih pteridina, jeste široko rasprostranjeno jedinjenje u prirodi. Prisutan je u gotovo svim ćelijama i tkivima sisara u kojima igra značajne fiziološke funkcije (5). Posebna aktuelnost ovog jedinjenja proizilazi iz činjenice da se BH_4 sintetiše iz GTP-a, nukleozid trifosfata koji funkcionišu u sklopu G proteina, proteina medijera pri funkcionisanju hormona; GTP je neophodan pri sintezi proteina, a istovremeno je i sastavni deo familije malih GTP-aza proteina (6).

Jedna od najbolje ispitivanih funkcija BH_4 jeste njegovo dejstvo kao prirodnog kofaktora hidrosilaza cikličnih amino kiselina – fenilalanin hidrosilaze (EC 1.14.16.2), tirozin-3-hidrosilaze (EC 1.14.16.3) i triptofan-5-hidrosilaze (EC 1.14.16.4) (7), kao i sva tri izoenzima azot oksid sintaze (NOS) (8); potreban je za aktivnost gliceril-etar-monooksigenaze (1.14.16.5) (1).

Prvo otkriće nekonjugovanih pteridina je vezano za upoznavanje pigmenta insekata. Snažan impuls na polju izučavanja BH_4 bilo je otkriće atipičnih neuroloških simptoma kod neke „fenilketonurične“ dece kod koje je perzistirala hiperfenilalaninemija uprkos poštovanju režima ishrane siromašne u fenilalaninu (9). Terapijska primena BH_4 uslovljavala je gubitak neuroloških simptoma i pad fenilalanina u krvi obolele dece. Brojne metaboličke bolesti povezuju se sa poremećajem funkcije ovih značajnih kofaktora intermedijernog metabolizma; 1959. godine BH_4 je dokazan kao kofaktor hidrosilaza aromatičnih amino kiselina. Njegovo učestće u reakcijama hidrosilacije fenilalanina, tirozina, triptofana, kao ključnog kofaktora fenilalanin hidrosilaze i drugih specifičnih hidrosilaza pomenutih amino kiselina intenzivirano je poslednjih desetak godina od kada je prikazana biosinteza BH_4 i putevi njegove razgradnje (1). Učestće BH_4 u regulaciji metabolizma monoaminergičnih neurotransmitera (dopamina, noradrenalina, serotonina) doprinelo je upoznavanju atipičnih neuroloških simptoma kod nekih formi „fenilketonurične“ dece (10). Pored ovih saznanja o ulogama nekonjugovanih pteridina u metabolizmu cikličnih amino kiselina i neurotransmitera, nedavno je dokazano prisustvo tetrahidrobiopterina kao kofaktora sva tri izoenzima azotoksid sintaze (NOS). Alkil-glicerol monooksigenaza, značajna za metabolizam lipida za svoju aktivnost zahteva tetrahidrobiopterin, pri čemu za sada nije sasvim jasna uloga ovog kofaktora u funkcionisanju pomenutog enzima.

U novije vreme pojavljuje se sve veći broj publikacija koje dokumentuju anomalije u metabolizmu nekonjugovanih pteridina kod osoba sa karcinomom kod kojih je karakteristično povećana urinarna ekskrecija neopterina, intermedijernog derivata pri sintezi BH_4 . Ovi radovi su potencirali ulogu neopterina kao „markera“ stimulacije imunog sistema.

Svi ovi radovi ukazuju posebno na značaj izučavanja metabolizma biopterina kod čoveka.

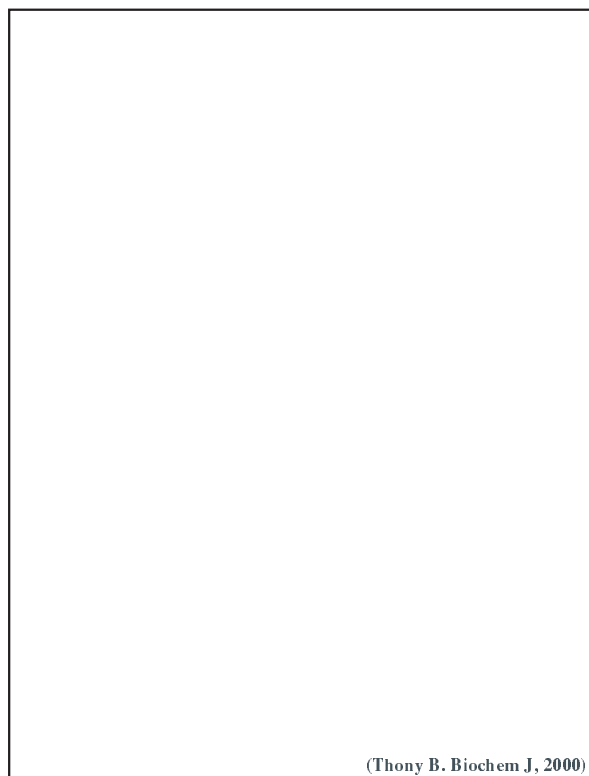
Sinteza i metabolizam nekonjugovanih pteridina

Još 1963. godine bila je postavljena hipoteza da sve količine tetrahidrobiopterina prisutnog u organizmu potiču od *de novo* biosinteze ovog jedinjenja jer je intestinalna apsorpcija BH_4 veoma slaba – (12 % u proseku) u poređenju sa apsorpcijom folne kiseline.

BH_4 je 2-amino-4-hidroksipteridin (trivlno ime pterin); on se klasifikuje kao nekonjugovani pterin da bi se razlikovao od njegovih srodnika, folata.

Biosinteza BH_4 u organizmu počinje razgradnjom guanozin trifosfat (GTP) (shema 1).

Za sada nije jasno otkriveno da li svako tkivo može ili ne može da proizvodi, in situ, dovoljne količine tetrahidrobiopterina. U prvoj reakciji GTP,



(Thony B. Biochem J, 2000)

Shema 1. Biosinteza tetrahidrobiopterina

1. GTP-ciklohidrolaza
2. 6-piru voil-tetrahidrobiopterin sintaza
3. sepiapterin reduktaza
4. 6-piru voil-tetrahidrobiopterin reduktaza
5. sepiapterin reduktaza
6. 2'-keto reduktaza

pod uticajem GTP ciklohidrolaza, prima molekul vode i uz gubitak mravlje kiseline prelazi u dihidroneopterin-trifosfat. GTP ciklohidrolaza prvi put je prečišćena i okarakterisana 1986.godine od strane japanskog naučnika Takikawa i sar.(5) Dihidroneopterin-trifosfat daljim dejstvom 6-piruvoil tetrahidropterin sintaze (6-PTS) gubi fosfat i prelazi u 6-piruvoil-tetrahidropterin koji dejstvom 6-piruvoil-tetrahidropterin reduktaze (PTR) prelazi u 6-laktoil-tetrahidropterin koji pod dejstvom sepiapterin reduktaze prelazi u tetrahidrobiopterin, BH_4 . Osnovne biohemijske funkcije BH_4 jesu kao kod ključnog kofaktora fenilalanin hidroksilaze i specifičnih hidroksilaza tirozina, triptofana. Takođe, tetrahidrobiopterin (BH_4) jeste kofaktor sva tri izoenzima azot oksid sintaze (NOS)

Uloga (BH_4) u fenilalanin hidroksilaznom sistemu

Reakcija hidroksilacije fenilalanina je obavezan i ključni stupanj u katabolizmu fenilalanina koji vodi do sinteze tirozina, amino kiseline neophodne za sintezu hormona tireoideje, hormona srži nadbubrega (adrenalina i noradrenalina) kao i pigmenta melanina. Kada je hidroksilacija fenilalanina deficitarna tirozin postaje esencijalna amino kiselina (7).

Fenilalanin hidroksilaznih sistema čine enzimi fenilalanin hidroksilaza (PAH), BH_4 - tetrahidrobiopterina i dihidropteridin reduktaze (DHPR). Fiziološka funkcija BH_4 je povezana sa njegovom sposobnošću da

redukuje molekularni kiseonik pribavljanjem elektrona što je direktno povezano sa uvođenjem OH grupe u fenilalanin i stvaranjem tirozina. U ovoj reakciji nastaje dihidrobiopterin $-qBH_2$ koji redukcijom, dejstvom enzima dihidropterin reduktaza (DHPR) regeneriše BH_4 .

Drugi enzim može da igra ulogu u hidroksilaciji fenilalanina *in vivo*; to je dihidrofolat reduktaza (DHFR) (EC 1.6.99.7). Ovaj enzim ima dobro definisanu ulogu u prevođenju dihidrofolne kiseline u tetrahidrofolnu kiselinu :

$$7,8\text{-dihidrofolat} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{tetrahidrofolat}$$

Ovaj enzim može da katalizuje analognu reakciju sa 7,8-dihidrobiopterinom :

$$7,8\text{-dihidrobiopterin} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{tetrahidrobiopterin} + \text{NADP}^+$$

Eksperimentalna istraživanja ukazuju na mogućnost da DHPR može da obezbedi jednim delom redukciju folata u mozgu gde je dihidrofolat reduktaza veoma slabo aktivna (7).

Analogno fenilalanin hidroksilaznom sistemu BH_4 obezbeđuje aktivnost tirozin-3-hidroksilaze (EC 1.14.16.3) pri čemu nastane 3,4- dihidroksifenilalanin (DOPA) i triptofan-5-hidroksilaze (EC 1.14.16.4) kada nastaje 5-OH-triptofan iz koga se sintetiše 5-OH triptamin – serotonin (11).

Uloge tetrahidrobiopterina u funkcionisanju azot oksid sinteze (NOS)

Azot monoksid (NO) jeste aktivni agens u dilataciji krvnih sudova. Izvor NO koji se oslobađa iz vaskularnog endotelijuma jeste gvanidino grupa amino kiseline L-arginina. Dejstvom azot oksid sintaze (NOS) molekul arginina se u prisustvu molekularnog kiseonika i NADPH cepa na citrulin, NO i NADP; Atomi kiseonika koji se inkorporiraju i u citrulin i u NO potiču iz atmosferskog kiseonika. Pretpostavlja se da proces oksigenacije posreduje (obezbeđuje) tetrahidrobiopterin (BH_4), analogno reakciji hidroksilacije fenilalanina pri delovanju fenilalanin hidroksilaze (11).

Katabolizam

Otežano izučavanje katabolizma BH_4 proističe iz njegove nestabilnosti. Glavni metaboliti pri razgradnji BH_4 jesu neopterin i biopterin. Neopterin nastaje putem defosforilacije i oksidacije dihidro-neopteritriofosfata, jedinjenja koje nastaje delovanjem GTP-ciklohidrolaze; biopterin je oksidativni produkt dihidro- i tetrahidrobiopterina. Oba metabolita se u najvećoj meri izlučuju urinom u redukovanoj i oksidisanjoj formi (5).

Rasprostranjenost nekonjugovanih pteridina u biološkim tečnostima

Veliki broj nekonjugovanih pteridina bio je identifikovan u biološkim tečnostima čoveka. Izlučivanje pteridina urinom zavisi od starosti; u prvim mesecima života izlučuju se neopterin i biopterin (N/B) u odnosu