

## **Poly-/mono-aminer och Chronic Fatigue Syndrome.**

### **Introduktion.**

Chronic Fatigue Syndrome (CFS) är en sjukdom för vilken man trots omfattande forskning ännu inte kunnat påvisa något etiologiskt agens. Många patienter drabbas av CFS efter att ha insjuknat i en influensaliknande infektion. Mycket talar för att CFS förorsakas av en kvarstående "lågvirulent" virusinfektion efter ett mer eller mindre akut eller subakut skede av infektionen. För att ett virus skall kunna "överleva" hos sin värd måste det på något sätt "lura" eller hämma immunsystemet.

Det finns indikationer på att CFS förorsakas av ett virus som stimulerar en merproduktion av polyaminer (PA) som ett sätt att hämma värdens immunsystem. Polyaminer (bl a putrescin, spermidin, spermin) är immunsuppressiva vilket har visats i ett flertal studier. Vid matabolismen av PA bildas beta-alanin som utsöndras i urinen. I en studie av McGregor et al (1) kunde man visa att CFS-patienter hade en signifikant ökad utsöndring av beta-alanin och att det också förelåg en stark korrelation mellan ökad beta-alanin utsöndring och graden av CFS-symtom (27). Dessa fynd är helt i överensstämmelse med hypotesen att CFS orsakas av en pågående virusinfektion där viruset inducerar en ökad produktion av PA. För att testa denna hypotes har en pilotstudie, poly-/mono-aminer (PMA) analyserats från dygnsmängd urin som samlats av CFS-patienter och friska försökspersoner. Denna studie har genomförts i ett samarbete mellan Birgitta Evengård, Infektionskliniken, Huddinge sjukhus och Ulf Hannestad, Institutionen för Biomedicin och Kirurgi, Avdelningen för klinisk kemi, Linköpings Universitet.

### **Material och metoder.**

Under hösten 2002 samlade 6 st CFS-patienter (3 kvinnor + 3 män) och 12 friska (6 kvinnor + 6 män) vardera en dygnsmängd urin. Urinen samlades i 3 l plastdunk med tillsats av 15 mL saltsyra 6 mol/L.

Efter att urinvolymen bestämts genom vägning hölls c:a 30 mL över i provrör och förvarades vid -20° C. Kreatininkoncentrationen bestämdes på varje urinprov.

I Tabell 1 redovisas data för friska försökspersoner vad gäller ålder, kön, urinvolym och kreatinin. Motsvarande data för patienter finns i Tabell 2.

Alla urinprover analyserades dels efter sur hydrolys och dels direkt utan hydrolys. Vid varje analys av urinprover analyserades också standardlösningar i fyra olika koncentrationer av följande PMA: putrescin, beta-alanin, GABA, spermidin, spermin. Standardlösningarna behandlades på samma sätt som urinproverna.

### *Analys med hydrolys.*

Från den vid insamlingen surgjorda urinen togs 25 µL och blandades med 100 µL lösningen med inre standard (aminokaprylsyra, 0,05 mmol/L i HCl, 0,1 mol/L).

Därefter tillsattes 125 µL HCl, 6,0 mol/L och hydrolysen fick pågå i 4 timmar vid 120° C.

Provet blåstes därpå till torrhet med kvävgas på värmeblock vid 60° C. Eventuella karboxylsyror derivatiserades genom förestring med 200µL av 1,5 mol/L acetylklorid i 1-hexanol (15 min vid 120° C). Proverna blåstes till torrhet och aminogrupper derivatiserades med 50 µL heptafluorosmörtsyraanhydrid i 200 µL etylacetat (15 minuter vid 90° C). Därefter blåstes till torrhet på nytt och derivatiserade PMA extraherades med 2X 1,0 mL etylacetat från 250 µL fosfatbuffert, 0,2 mol/L pH 7,0. De två etylacetatfaserna slogs samman och blåstes till torrhet. Den torra återstoden löstes i 400 µL etylacetat och analyserades med gaskromatografi-masspektrometri (GC-MS).

#### *Analys utan hydrolys.*

Denna analys utfördes på samma sätt som med hydrolys frånsett att tillsatts av HCl, 6 mol/L och värmning 4 tim vid 120° C uteslöts.

#### **Resultat.**

För varje amin (putrescin, beta-alanin, GABA, spermidin, spermin) erhöles en standardkurva med vars hjälp koncentrationen av PMA kunde bestämmas i de enskilda urinerna. Dygnsutsöndringen av PMA bestämdes med hjälp av de uppmätta urinvolymer. Mängderna av putrescin, spermidin och spermin i urinerna var alltför låga för att kunna koncentrationsbestämmas med den urinvolymer (25 µL) som användes för analys i denna studie. För att bestämma dessa PA bör man använda sig av en större provvolymer och ett anriknings- och reningssteg i analysen. Efter urinhydrolys hade friska försökspersoner följande dygnsutsöndringar av beta-alanin: 229,2 µmol/L (medelvärde (mv) med range 115,6 - 610,5 µmol/L (Tabell 3) medan motsvarande värden för patienter var 500,5 µmol/L (mv) och range 68,7 – 2169,3 µmol/L (Tabell 4). Dygnsutsöndringen av GABA efter hydrolys var för friska 80,6 µmol/L (mv), range 56,4 – 120,6 µmol/L (Tabell 3) och för patienter 77,7 µmol/L (mv), range 37,6 – 114,2 µmol/L (Tabell 4).

Utan urinhydrolys hade friska försökspersoner följande dygnsutsöndring av beta-alanin : 77,5 µmol/L (mv) med range 6,7 – 150,3 µmol/L (Tabell 5) medan motsvarande värden för patienter var 141,3 µmol/L (mv) och range 22,0 – 485,2 µmol/L (Tabell 6). Dygnsutsöndringen av GABA utan hydrolys var för friska 24,5 µmol/L (mv), range 8,0 – 52,6 µmol/L (Tabell 5) och för patienter 27,2 µmol/L (mv), range 8,5 – 53,8 µmol/L (Tabell 6). För beta-alanin respektive GABA beräknades ett normalområde utgående från dygnsutsöndringen hos de tolv friska försökspersonerna. Normalområdet beräknades som  $mv \pm 2$  standardavvikelser. För analys efter urinhydrolys gäller följande normalområden: beta-alanin < 498 µmol/dygn och för GABA 42 – 119 µmol/dygn.

Utan hydrolys gäller dessa normalområden: beta-alanin < 158 µmol/L och för GABA < 50 µmol/L. Dygnsutsöndringen av respektive beta-alanin och GABA efter hydrolys visas i Figur 1 och Figur 2 för enskilda friska och patienter med angivande av normalområde (streckad linje). Motsvarande värden utan hydrolys visas i Figur 3 respektive Figur 4.

#### **Diskussion.**

Polyaminerna putrescin, spermidin och spermin är polyvalenta, vid fysiologiskt pH positivt laddade alifatiska aminer som förekommer i alla levande organismer. PA syntetiseras från ornithin och arginin via starkt reglerade enzymssystem där två dekarboxylaser är extremt inducerbara och har synnerligen kort halveringstid (2-5). Detta gäller speciellt ornithindekarboxylas (ODC) som är det hastighetsbestämmande

enzymet i PA-syntesen när putrescin bildas från ornithin. ODC har in vivo en mycket kort halveringstid på endast 10 – 20 minuter (6).

PA omsätts till ett antal metaboliter vars funktion till stor del är okända. Figur 5 (från (2)) visar hur putrescin vid nedbrytning bildar GABA och 5-hydroxypyrrolidone. Putrescin omvandlas också enzymatiskt till spermidin som i sin tur kan bilda spermin. Vid nedbrytningen av både spermidin och spermin bildas beta-alanin. PA och ODC förekommer i all human vävnad och är väsentlig för flera cellulära och fysiologiska funktioner. Flera djurstudier har visat att PA kan vara involverade i flera metaboliska och elektrofysiologiska processer i centrala nervsystemet (CNS). Man har funnit att PA bl a reglerar jonflöden, påverkar neurala jonkanaler och även modulerar flera receptorer för neurotransmittorer (6-7).

#### *Utsöndring av beta-alanin och GABA.*

I denna studie fann vi att fem av sex CFS-patienter hade normala utsöndringar av både beta-alanin och GABA. Den sjätte patienten, P1, man 48 år, hade även han en GABA-utsöndring inom normalområdet men hade en kraftigt förhöjd koncentration av beta-alanin i sin urin. Dygnsutsöndringen av beta-alanin hos patient P1 var 2 169  $\mu\text{mol/dygn}$  vilket är c:a tio gånger så stor som medelvärdet (229  $\mu\text{mol/dygn}$ ) av beta-alanin-utsöndringen hos friska försökspersoner. Man kan misstänka att den stora mängden beta-alanin hos denne patient har samband med CFS-sjukdomen och att den mycket förhöjda utsöndringen orsakas av en störd metabolism av PMA. Troligt är också att denna störning orsakas av ett virus som inducerar en ökad produktion av putrescin och övriga PMA i CNS. Både beta-alanin och GABA är nedbrytningsprodukter från PA, Figur 5.

Anledningen till att endast en patient hade förhöjd utsöndring av beta-alanin är förmodligen att det endast i mer akuta skeden av CFS eller vid skov som störningen i PMA-metabolismen är tillräckligt stor för att kunna ses som en förhöjd utsöndring i urinen. I mer lugna skeden av CFS "drunknar" produkterna från denna störning i den normala omsättningen och produktionen av PMA och deras metaboliter. En liten ökad produktion av PMA lokalt i t ex CNS kan dock, utan att vara påvisbar i urinen, förorsaka störningar av neurotransmittorer och signalsystem i CNS. GABA kan endast i liten utsträckning passera blod-hjärnbarriären och en ökad halt i CNS kan därför inte förväntas vara påvisbar i urinen. Vad gäller beta-alanin är det okänt om dess förmåga att passera blod-hjärnbarriären.

I denna pilotstudie är patientmaterialet litet och ett större antal CFS-patienter i olika faser av sjukdomen behöver undersökas för att fastställa hur ofta en ökad beta-alanin-utsöndring kan påvisas. McGregor et al (1) har dock klart kunnat påvisa ett signifikant samband mellan CFS och ökad beta-alanin-utsöndring. Dessutom fann man också en signifikant korrelation mellan mängden beta-alanin och graden av symptom hos CFS-patienterna (27).

#### *CFS och påverkan på centrala nervsystemet.*

Om man antar att CFS förorsakas av ett "lågvirulent"/opportunistiskt virus som lokalt infekterar CNS skulle ett sådant virus mycket väl kunna inducera en ökad produktion av PMA. Detta skulle vara gynnsamt för virusets "överlevnad" eftersom PMA är immunsuppressiva. En virusinducerad produktion av PMA skulle också medföra en ökad halt av PMA-metaboliterna GABA och beta-alanin i CNS. GABA är den viktigaste inhibitoriska neurotransmittorn i CNS (9). Genom att underlätta för negativa kloridjoner att förflyttas in i nervcellerna inhiberar GABA den presynaptiska frisättningen av neurotransmittorn genom en positiv polariseringspuls. Sådan

inhibition är extremt vanlig, GABA-receptorer kan påvisas hos 60-80% av nervcellerna i CNS. GABA hämmar transmissionen av flera viktiga signalsubstanser, bl a noradrenalin, serotonin, dopamin och acetylkolin.

En virusinducerad ökning av GABA i CNS skulle troligen kunna ligga bakom många av de neurologiska symtom som är karakteristiska för CFS. Flera av de antiepileptika som finns på marknaden, t ex bensodiazepinderivat, valproinsyra, vigabatrin, utövar sin effekt genom att höja koncentrationen av eller underlätta transmissionen av GABA. De biverkningar som dessa antiepileptika ger på grund av ökad GABA-aktivitet påminner också mycket om de symtom som är typiska för CFS: somnolens, trötthet, huvudvärk, förvirring, minnesstörningar, störd eller minskad koncentration, reducerad vakenhet, depression, tankestörningar.

En studie har gjorts av koncentrationer och distribution av PA i human CNS. Man anser att PA i CNS bl a reglerar receptorfunktion, kontrollerar synaps- och nervcellsaktivitet samt potentiellt har betydelse för inläring och minne (24).

#### *CFS, PMA och hypotalamic pituitary adrenal axeln.*

I ett flertal studier har man visat att CFS-patienter har en störning av hypotalamic pituitary adrenal (HPA) axeln (10). Störningen yttrar sig bl a i form av låga halter av cirkulerande kortisol och anormala svar på neuroendokrinologiska stimulerings tester. I ett antal arbeten har man kunnat påvisa ett klart samband mellan GABA-receptoraktivitet och funktionen hos HPA-axeln (11-15). En ökad GABA-aktivitet genom stimulering av GABA-receptorer ger en tydlig inhibitorisk effekt på HPA-axeln och kan också signifikant reducera ACTH (kortikotropin)-svaret på metyrapone-inducerad inhibition av glucocorticoid feedback.

En virusbetingad induktion av PMA och medföljande ökad koncentration av GABA i CNS skulle mycket väl kunna förklara de fynd som gjorts av störd HPA-axel hos CFS-patienter.

#### *PMA och immunsuppression.*

Det är sedan länge känt att PA har immunsuppressiva effekter. Den mest studerade PA är spermin som bl a inhiberar proliferation av mördarceller och T-lymfocyter (16-19). De högsta koncentrationerna av spermin i kroppen (5 – 15 mmol/L) finns i seminalplasma. Flera studier har utförts där spermins immunsuppressiva effekt studerats och dess eventuella samband med fertilitetsproblem (20-22). Det är säkert ingen slump att de högsta koncentrationerna av PA/spermin finns i seminalplasma och att mycket höga aktiviteter av ODC återfinns i prostatavävnad. Man kan förmoda att de höga halterna av spermin och därmed följande starka immunsuppressiva effekt hindrar att spermier skadas av en reaktion från kvinnans immunförsvar (22).

Om ett virus orsakar CFS och vid en infektion inducerar en ökad aktivitet av ODC skulle merproduktionen av PMA genom sin immunsuppressiva effekt skydda viruset mot värdens immunförsvar.

#### *CFS och virus.*

Mycket talar för att CFS förorsakas av en virusinfektion. Hos de flesta patienter som har CFS har en mer eller mindre en akut influensaliknande sjukdom föregått symtomen som är typiska för CFS. Många gånger har man också sett andra tecken på att CFS orsakas av ett infektiöst agens. Det finns flera fall beskrivna där ett större antal personer i en mer eller mindre isolerad krets drabbats av en influensaliknande infektion och som sedan utvecklade CFS. Detta har inträffat bl a vid sjukvårdsinrättningar och liknande institutioner.

Man kan använda humant cytomegalvirus (HCMV) som "modell" för hur ett virus skulle kunna orsaka CFS. HCMV är ett herpesvirus som skiljer sig från t ex herpes simplex virus genom dess oförmåga att producera virusspecifikt tyimidinkinas. HCMV "drar nytta av" den infekterade cellens egna enzymsystem genom stimulering/induktion av bl a cellens tyimidinkinas, DNA polymeras samt protein-, RNA-, och DNA-syntetas (8). Det har visats att HCMV också vid infektion inducerar en markant ökning av ODC-aktiviteten och att denna virusinducerande aktivitetsökningen inte, som normalt, regleras av slutproduktinhibitionen (8). Den ökade aktiviteten av ODC medför en ökad produktion av PMA som genom sin immunsuppressiva effekt kan skydda HCMV från värdens immunförsvar. Inga övertygande samband har kunnat påvisas mellan CFS och HCMV. Av intresse är dock att man nyligen har funnit p52 och CM2 HCMV serum antikroppar hos en del CFS-patienter Tydande på ofullständig HCMV-replikation och detta antyder ett samband mellan HCMV och CFS hos dessa patienter (23).

#### *PMA, ODC och difluormetylnithin.*

ODC är det hastighetsbestämmande steget i biosyntesen av PA. Difluormetylnithin (DMFO) är en irreversibel hämmare av ODC so inhiberar PA-produktionen och sänker koncentrationerna av PA i vävnad (25-26). DMFO (eflornithine,Ornidyl®) används för att behandla Afrikansk sömnsjuka, en sjukdom som beror på infektion av protozoer, bl a Trypanosoma brucei gambiense. DMFO används för behandling av sömnsjuka och kan även med framgång användas för behandling av CNS-infektion med T. gambiense. ODC hos T. gambiense omsätts inte lika snabbt som hos människa vilket gör parasiten känslig för inhiberingen av enzymet. ODC är nödvändigt för parasitens fortlevnad hos den infekterade. DMFO har även använts i ett stort antal studier för behandling av olika typer av cancersjukdomar med varierande framgång. DMFO hämmar bildningen av PA som är nödvändiga för cell-och cancer-tillväxt. Det finns stor erfarenhet med behandling med DMFO, dess biverkningar är väl kända och kan bedömas som i de flesta fall ej allvarliga. Om CFS orsakas av ett virus i CNS som inducerar ODC-aktiviteten med ökad PA-produktion som följd skulle behandlingen med DMFO möjligen kunna "kupert" CFS-symptomen. Eftersom omsättningen av ODC är mycket snabb borde man efter ganska kort tids behandling med DMFO kunna se effekter av hämrad ODC-aktivitet, normaliserad PMA-produktion och försvinnande av de symptom som en överproduktion av GABA kan ge. I det fall CFS förorsakas av en virusinfektion bör förutsättningarna för behandling av CFS med DMFO vara goda eftersom behandlingen av CNS-infektion med trypanosoma visar att DMFO passerar blodhjärn-barriären.

#### **Slutsatser.**

Denna pilotstudie har visat att hos en del av CFS-patienter kan en betydligt förhöjd utsöndring av beta-alanin i urin påvisas. Detta förhållande fann också McGregor et al (1) som bland 20 CFS-patienter fann en signifikant ökad utsöndring av beta-alanin jämfört med friska kontroller. En möjlig och trolig orsak till denna ökade utsöndring är att CFS orsakas av en pågående infektion av ett lågvirulent/opportunistisk virus som inducerar en ökad aktivitet av ODC, ökad produktion av PMA och deras metaboliter, därav följande ökad utsöndring av beta-alanin. En ökad produktion av bl a GABA i CNS skulle kunna vara förklaringen till de typiska symtomen hos CFS-patienter. Materialet i denna studie, sex patienter, är litet, men den avvikelse som påvisats från friska försökspersoner tillsammans med McGregors (1) resultat stöder ovanstående

hypotes och bör göra det angeläget att undersöka ett större antal CFS-patienter med avseende på PMAutsöndring. Av intresse vore också att försöka indela patienterna i olika grupper utifrån grad av symptom för att se om PMA-utsöndringen kan korreleras till symptombild.

Ett sätt att pröva ovanstående hypotes och kanske lindra symptomen hos CFS-patienter vore att behandla ett antal patienter med DMFO. Under en väl kontrollerad behandling av ett begränsat antal CFS-patienter bör riskerna för allvarliga biverkningar vara näst intill obefintliga.

---

Linköping 2003-02-24

Ulf Hannestad

### Förkortningar.

GABA	gamma-aminosmörtsyra
PMA	poly-/mono-aminer
CFS	Chronic Fatigue Syndrome
PA	polyaminer
Mv	medelvärde
ODC	orithindekarboxylas
HPA	hypotalamic pituitary adrenal axeln
HCMV	humant cytomegalvirus

### Tabell 1

Data friska försökspersoner

Person-kod	Ålder år	Kön	Urinvolym mL	Urinkreatinin mmol/L
N1	40,3	Kvinna	786	11,3
N2	44,5	Kvinna	1 353	6,8
N3	40,0	Man	1 147	13,6
N4	41,9	Kvinna	2 390	4,85
N5	40,0	Man	3 048	5,0
N6	37,8	Kvinna	1 150	8,0
N7	36,9	Kvinna	1 072	8,45
N8	42,7	Man	786	16,85
N9	40,3	Kvinna	2 931	2,9
N10	41,9	Man	1 490	7,65
N11	35,9	Man	645	18,25
N12	40,6	Man	1 688	10,85

**Tabell 2**

Data, patienter

Patient-kod	Ålder år	Kön	Urinvolym mL	Urinkreatinin mmol/L
P1	48	Man	2 070	8,0
P2	26	Kvinna	836	8,65
P3	37	Man	2 418	6,3
P4	33	Man	2 727	4,9
P5	44	Kvinna	2 964	3,0
P6	36	Kvinna	2 292	1,8

**Tabell 3**

Dygnsutsköning efter hydrolys, friska personer

Person-kod	beta-alanin $\mu\text{mol/d}$	GABA $\mu\text{mol/d}$
N1	121,2	58,6
N2	115,6	56,6
N3	610,5	86,3
N4	158,8	78,2
N5	276,3	96,5
N6	191,5	87,5
N7	147,8	67,6
N8	210,1	80,0
N9	201,9	99,4
N10	192,6	79,8
N11	196,3	56,4
N12	328,1	120,6

#### Tabell 4

Dygnsutsöndring efter hydrolys, patienter

Patient-kod	beta-alanin $\mu\text{mol/d}$	GABA $\mu\text{mol/d}$
P1	2 169,3	109,6
P2	68,7	41,7
P3	178,1	82,3
P4	160,2	81,0
P5	357,5	114,2
P6	69,4	37,6