

Egyetemi Doktori (PhD) értekezés

**A KARNITIN BIOSZINTÉZISRE HATÓ GYÓGYSZEREK ÉS
METABOLITOK**

Farkas Viktória

Pécsi Orvostudományi Egyetem

Biokémia Intézet

1998

**Programvezető:
dr. Sümegei Balázs**

**Témavezető:
dr. Sándor Attila**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK	4
CÉLKITÚZÉSEK	9
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	10
EREDMÉNYEK	15
I. A karnitin bioszintézisének gátlása Valproáttal és a gátlás mechanizmusa	15
I. 1. <i>A karnitin szintézis gátlásának bizonyítása</i>	15
I. 2. <i>A Valproát okozta karnitin szintézis gátlás mechanizmusa</i>	19
II. A fenilalanin lebontás metabolitjainak hatása a karnitin bioszintézisre	24
II. 1. <i>A gátlást mutató metabolit kiválasztása, a gátlás bizonyítása</i>	24
II. 2. <i>A Fenilecetsav okozta karnitin szintézis gátlás mechanizmusa</i>	28
II. 3. <i>A Fenacetil-karnitin (FEAK) létének bizonyítása patkány májában</i>	29
II. 4. <i>Fenilketonuriában szenvedő betegek karnitin státusza</i>	32
AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	35
IRODALOM	38
JELÖLT PUBLIKÁCIÓI	42

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

Bu	Butirobetain
CoA	koenzim A
CAT	karnitin acetyl-transzferáz
COT	karnitin oktanoil-transzferáz
CPT	karnitin palmitoil-transzferáz
FEAK	Fenacetyl-karnitin
FES	Fenilecetsav
Glu	L-Glutamát
i.p.	intraperitoneális
α -KG	α -Ketoglutársav
Phe	L-Fenilalanin
PKU	Fenilketonuria
VPS	Valproilsav, Valproát
GS-MS	Gáz kromatográf-tömegspektrográf
RLK	Rövid Láncú Acilkarnitin
HLK.	Hosszú Láncú Acilkarnitin

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

Az L-karnitint (L-3-OH-4-N-trimetil-aminobutirát), mint az izomszövetben jelentős mennyiségben előforduló vegyületet, 1905-ben fedezték fel (1), 1927-ben tisztázták kémiai szerkezetét (Ref. 2, 1. Ábra). A vegyület intenzív kutatás tárgyává akkor vált, amikor a zsírsavak lebontásában játszott alapvető szerepét felismerték. Carter és munkatársai 1952-ben állapították meg, hogy a *Tenebrio Molitor* szervezetében a B₁ vitamin hiányában (T a *Tenebriora* utal) a zsír felszaporodik és a lárva ennek következtében "zsír-halált" hal, mert nem tudja saját zsírraktárait éhezéskor tápanyagforrásként felhasználni (3). A kutatásoknak további ösztönzést adott Fritz felismerése, hogy a karnitín patkánymáj homogenizátumban is nagymértékben fokozza a zsírsavak oxidációját (4).

A karnitinről való alapvető ismereteinket illetően az 5,6 szám alatt referált áttekintő irodalmakra utalunk, amelyek lényegét röviden a következőkben foglalhatjuk össze. Az L-karnitint az összes állatfajban, számos mikroorganizmusban és növényben előfordul. Két lehetséges sztereoizomer változata közül biológiailag csak az L izomer aktív. Koenzim A (CoA) észtereiről az acil csoportot specifikus enzimek (karnitint acil-transzferázok) segítségével reverzibilisen átveszi és makroerg O-acil észtert képez. Állati szervezetben ez az egyetlen enzimátikus reakció, amiben a karnitint molekula részt vesz, tehát katabolizmusban nincs, változatlanul vagy acil-karnitint formájában ürül a vizelettel. A transzferált zsírsav lánchosszúsága szerint három specifikus karnitint transzferáz létezik, úgymint:

- karnitint acetil-transzferáz (CAT) az acetát és a rövidláncú zsírsavak CoA észtereire számára. Mitokondriumban és citoszolban lokalizált.
- karnitint oktanoil-transzferáz (COT) a közepes lánchosszúságú zsírsavak számára. Lokalizációja mitokondrium, peroxiszóma és endoplazmatikus retikulum.
- karnitint palmitoil-transzferáz (CPT) a hosszúláncú zsírsavak számára. Kettősen lokalizált a mitokondriumban, a CPT I a külső membrán belső felületén, a CPT II pedig a belső membrán belső felületén helyezkedik el.

A mai ismeretek szerint a karnitint elsődleges biológiai funkciója a hosszú szénláncú zsírsavak elégetéséhez kötött: az aktivált zsírsavakat a citoplazmából

bejuttatja a mitokondrium mátrixába, mivel a hosszúláncú zsírsavak és CoA észterek számára a mitokondrium belső membránja nem permeábilis. A folyamat menete a következő: a CoA észterről a zsírsavak a CPT I enzim segítségével karnitinre kerülnek át. Az acilkarnitin a mitokondrium belső membránjában lévő karnitin transzlokáz segítségével bekerül a matrixba egy cseretranszport folyamatban, miközben egy szabad karnitin molekula lép ki (7). A matrixba bejutott acilkarnitinről az acilcsoportot a CPT II CoA-ra transzferálja, a CoA észter pedig a β -oxidáció folyamatában feldarabolódik acetyl-CoA egységekre és elégget.

A karnitinnak zsírégetésben betöltött funkcióján kívül egyéb, metabolikus szerepei is vannak:

- 1./A rövidláncú aciltranszferáz (CAT) segítségével az acilcsoportokat átveszi a CoA-ról, növelve ezáltal a szabad koenzim A koncentrációját, mely alapvetően fontos egyéb enzimreakciók (piruvát dehidrogenáz, citrát kör) számára. (8).
- 2./ Szintén a CAT és a COT segítségével kórosan jelenlévő és felszaporodott (esetleg arteficiális ok miatt felszaporodott) rövid és középláncú savakat vesz át CoA -ról, és a 2. pontban említett funkción kívül lehetővé teszi ezen savak szervezetből való eliminálását.

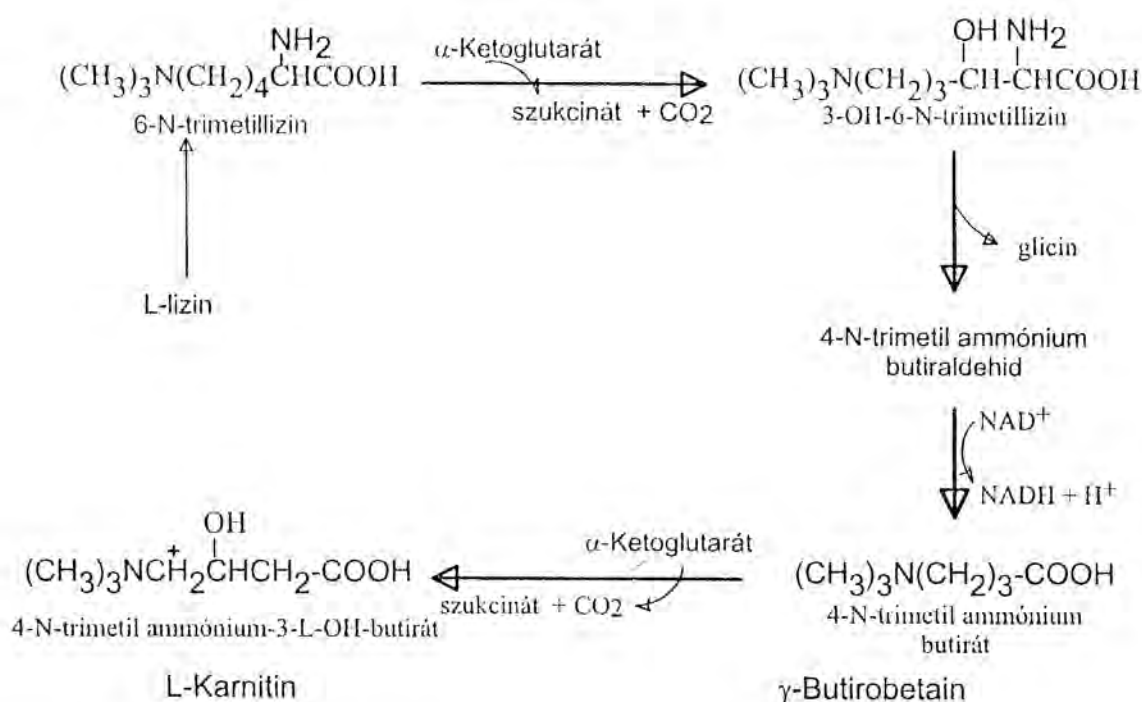
Mint a fentiekből érzékelhető, a karnitinnel kapcsolatos kutatások a legelméletibb biokémiától (pl. enzimkinetika) a klinikai gyakorlatig terjednek. A kutatásokat az első karnitin deficiencia okozta kórkép felismerése terelte gyakorlati irányba (9), amely mai ismereteink és osztályzásunk szerint elsődleges karnitin deficiencia volt. Ismeretesek továbbá a másodlagos karnitin deficienciák, melyek anyageserebetegségekhez társulnak (pl. aminoaciduriák) vagy lehetnek arteficiálisak, amelyeket gyógyszerek okoztak. (10). A karnitin deficienciák felismerése visszahatva az elméleti kutatásokra a karnitin bioszintézisének és transzportjának kérdését helyezte előtérbe.

A karnitin bioszintézisére minden emlős képes, a szervezet saját igényét részben ebből, részben a táplálékkal felvett külső forrásból elégíti ki. Kiinduló szubsztrátja a proteinhez kötött trimetillizin. A szintézis útját az 1. Ábra. mutatja.

A szintézisben résztvevő két hidroxilező enzim ko-szubsztrátként α -ketoglutarátot (α -KG) és oxigént, az oxigén aktiválásához Fe^{++} ionokat és redukáló ágensként aszkorbinsavat igényel. A szintézisben résztvevő enzimek minden szervben megtalálhatók, kivéve az utolsó hidroxilezést végző enzimet, a

butirobetain-hidroxilázt (EC 1,14,11,1.), ami egyes fajokban (ember, höresög, nyúl, majom és macska) a májban és a vesében, más fajok esetében (egér és patkány) csak a májban fordul elő (5). Az enzimre jelen dolgozat szempontjából külön felhívnom a figyelmet, mivel az általa katalizált reakciót, a butirobetain-karnitinné való átalakítását többször vizsgáltuk, megítélendő a karnitin bioszintézis sebességének változását. A kész karnitin molekula előállításának helye tehát a munkában kísérleti állatként használt patkányban kizárólag a máj.

1. Ábra. A karnitin bioszintézisének sémája.



Munkám a karnitin deficienciák, pontosabban a másodlagos karnitin deficienciák vizsgálatára irányult. Mind a metabolikus anyagcserebetegségekhez társult, mind a gyógyszerek okozta karnitin deficienciák kialakulásának leggyakrabban megfigyelhető közös mehanizmusa, hogy a felszaporodott savak, illetve maga a gyógyszer karnitin észtert képez és ebben a formában ürülve a vizelettel a karnitin nagymérvű vesztesét okozza (10). Ilyen például a propionsav a propionsav acidémiában (11) vagy a pivampicillin pivalinsav része (12).

A Valproilsav (Valproát, n-dipropil-acetát, VPS) multiplex hatásmechanizmussal rendelkező széles spektrumu antiepileptikus gyógyszer.

Az antikonvulzív aktivitás széles spektruma miatt a specifikus hatásmechanizmusra vonatkozó konklúziót nehéz levonni. Jelen hipotézisek a VPS hatásmechanizmusára vonatkozóan a feszültségfüggő Na^+ csatornákkal való lehetséges interakcióra és a γ -aminobutirát akkumuláció erősítésére összpontosítanak [13,14]. Antikonvulzív hatásához aktív metabolitjai hozzájárulhatnak, ugyanis az adott VPS-nak csak kis hányada ürül változatlanul a vizelettel vagy a széklettel, terápiás dózisban a szer többsége glükuronsav észter konjugáttá alakul, míg a maradék biotranszformációjáért a mitokondriális metabolizmus (β és ω oxidáció) a felelős. Ezen metabolitok közül például a 2-én-valproát csaknem olyan erős antikonvulzív ágens mint az apa komponens, és egy potenciálisan jelentős mértékben akkumulálódik a plazmában és az agyban (15-17).

Antikonvulzív tulajdonsága mellett a VPS számos mellékhatással is rendelkezik úgy mint hepatotoxicitás, hiperammonémia és karnitin deficiencia, melyek szinergikusan működhetnek [18,19]. A VPS terápia mellett kiegészítésként karnitin adagolást is alkalmaztak a gyógyszer ezen mellékhatásának ellensúlyozására (20).

Valproilsav esetén azonban a karnitin hiány kialakulásának mechanizmusa eltérő a szokásostól, azaz nem a gyógyszerrel képzett karnitin észter fokozott ürülése okozza a karnitin veszteséget. Bár az acilkarnitinek szérum koncentrációja és vizelettel távozó mennyisége VPS adására növekszik humán (21,22) vizsgálatok szerint és állatkísérletekben (23), azonban a beadott VPS dózisonak csak kb.1%-a ürül a vizelettel karnitin észter formájában, mint azt gáz kromatográf-tömegspektrográf (GC-MS) analízissel igazolták (24). VPS kezeléskor a vizeletben talált karnitin észterek többsége oktanoil- és hexanoil-karnitin észter (21). Úgy tűnik, hogy a VPS (és/vagy metabolitjai) a zsírsavoxidáció valamely lépését gátolja [18,25], ennélfogva szaporodnak fel a közepes és rövid láncú karnitin észterek.

Ezen hatások azonban önmagukban nem magyarázzák a karnitin deficiencia kialakulását. Míg szerves aciduriáknál a totál karnitin mennyisége a vizeletben sokszorosára növekszik [11,26], VPS-val kezelt patkányokban csak körülbelül kétszeresére növekedett (27), páciensekben csak enyhén nőtt (22), illetve egyes humán tanulmányokban a totál karnitin a vizeletben még csökkent is [20]

VPS terápia közben. Továbbá VPS kezelés hatására karnitin szövetekbe való felvételének gátlását is leírták (28) humán fibroblaszt sejten, mint modellen vizsgálva. Ez a hatás, ha *in vivo* is érvényesül, növekedett szérumban karnitin szintet és vizelettel való ürítést kellene, hogy eredményezzen, feltéve hogy a karnitin bioszintézis ugyanakkor változatlan marad. Ezek a megfigyelések vezettek bennünket a feltevéshez, hogy valamely más mechanizmus, nevezetesen a karnitin bioszintézisének gátlása is hozzájárulhat a VPS indukálta karnitin deficiencia kialakulásához.

A Valproát hatásmechanizmusának vizsgálata során, mikor is különböző vegyületek CoA szintekre illetve a butirobetain-karnitin átalakulás sebességére kifejtett hatását vetettük össze, megfigyeltük, hogy a benzooesav is gátolja a karnitin bioszintézisét. Ez vezetett bennünket arra, hogy benzooesav analóg természetes és kóros metabolitok valamint gyógyszerek hatását vizsgáljuk ebből a szempontból. Jelen munkámban a fenilalanin (Phe) lebontási termékeit vizsgáltuk. Gyakorlati szempontból külön jelentősége van a kóros Phe lebontás vizsgálatának. Ezek közül is legfontosabb a fenilalanin hidroxiláz enzim, (PAH, EC 1.14.16.1), veleszületett hiánya, amely a súlyos mentális retardációval járó fenilketonuria, (nemzetközi rövidítéssel PKU) betegség kialakulásához vezet (31). A szóbjáható vegyületek közül a fenilpiroszólósavat, fenilecetsavat (FES), amelyek közül különösen az utóbbi a PKU betegségben szaporodik fel, továbbá a homogentizinsavat vizsgáltuk, amely a homogentizinsavuria nevű ártatlannak tekintett Phe lebontási anomáliában jelenik meg.

CÉLKITŰZÉSEK

A kísérleteket úgy terveztük, hogy a következő kérdésekre kapjunk választ:

- gátolja-e a VPS a karnitin bioszintézisét patkányban? Erre a kérdésre a [³H]Bu és a jelöletlen Bu karnitinné történő átalakulásának vizsgálatával kerestünk választ. Más szóval kifejezve, a karnitin bioszintézis utolsó enzimjén, a Bu- hidroxilázon keresztül való fluxust mértük.
- mi a VPS karnitin szintézist gátló hatásának mechanizmusa:
 1. Ezen belül felmerül a CoA és acetyl-CoA szintek, továbbá a Bu- hidroxiláz kofaktorainak, az aszkorbinsav és az α -KG szinteknek a befolyásolása.
 2. Szükséges a karnitin, karnitin észterek és a Bu szintek mérése májban, plazmában a karnitin státusz megítélése végett.
 3. Miután a VPS az α -KG szint csökkenését eredményezte, vizsgáljuk, hogy α -KG adása kivédi-e a gátlást, bizonyítandó ezzel a mechanizmust.
- a FES, a fenilpiroszólósav és a homogentizinsav fejt-e ki hatást a karnitin bioszintézisére patkányban a fenti módszerekkel vizsgálva.
- a leghatásosabbnak bizonyult FES lehetséges hatásmechanizmusának vizsgálata a fenti módszerekkel
- PKU-ban szenvedő betegek karnitin státuszának vizsgálata
- egy feltételezett új metabolit, a fenacetil karnitin (FEAK) létének bizonyítása patkány májában, esetleg PKU betegek vizeletében.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

A VPS nátrium só formájában a Gerot Pharmazeutika (Bécs, Ausztria) ajándéka volt. Az L-karnitin a Sigma-Tau (Rome) cég ajándéka volt. Az Acetil-CoA-t magunk preparáltuk ecetsavanhidridből és koenzim A (CoA)-ból leírt eljárás szerint (29). A [³H]Butirobetaint körülbelül 10⁶ cpm/nmol specifikus aktivitással szintetizáltuk 4-N-dimetilamino-vaajsavból (Aldrich Chemical) és [³H]₃CJ-ból (Amersham, UK) leírt eljárás szerint (30). A [1-¹⁴C]Acetil-CoA-t az Amersham (UK) cégtől vásároltuk. Az összes többi speciális finomvegyszer a Sigma-Aldrich (Budapest) cégtől származik.

Betegek

A PKU betegek anyagait a SZOTE Gyermekklinika (dr. László Aranka) és a budapesti PKU centrum (dr. Schüller Ágnes) bocsátotta rendelkezésünkre. A kiválasztott 19 beteg fiatal felnőtt beteg (10 férfi és 9 nő) életkora 19-től 32 éves korig terjedt és minden korlátozás nélküli vegyes táplálkozási rendben éltek. Plazma fenilalanin szintjük Guthery test szerint 20-50 mg% közé esett.

Állatok és kezelésük

A kísérletekhez 200-250g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk. A kísérletek délelőtt 9 és 12 óra között történtek. Az állatok a vizsgált anyagot 1.0 ml 0.9%-os semlegesített NaCl oldatban intraperitoneálisan (i.p.) kapták 1 órával leölésük előtt. A kontrollokat NaCl oldattal injektáltuk. Azokban a kísérletekben, ahol a beadott anyagnak a radioaktív vagy a nem-radioaktív butirobetainnak a karnitinné való átalakulásra gyakorolt hatását vizsgáltuk, az állatok a butirobetaint 30 perccel később, azaz 30 perccel leölésük előtt, ugyanilyen módon kapták. A radioaktív kísérletekben általában 1.5x10⁷ cpm [³H]butirobetaint adtunk. Az állatokat enyhe anesztézia után dekapitálással öltük le, a vért heparinizált csövekbe

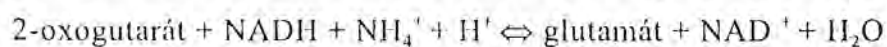
gyűjtöttük, a májakat és egyéb vizsgált szerveket pedig frissen folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk analízisig.

Metabolitok analízise

Az analízisek általában semlegesített perklórsavas extraktumból történtek. A semlegesítő ágens minden esetben KOH volt.

1./ A karnitin és észtereinek meghatározása. A karnitint radioizotópos enzimatisz analízissel határoztuk meg (32), amelynek elve röviden a következő. $[1-^{14}\text{C}]$ Acetil-CoA-ról CAT enzim segítségével az $[1-^{14}\text{C}]$ Ecetsavat karnitinre visszük át és ily módon a mintában jelenlevő karnitint quantitative radioaktív acetilkarnitinné alakítjuk. Az elegyet kis Pasteur pipettában lévő anioncserélő gyantán (pl. Dowex 1 x 8, Cl^- formában) átfolyatjuk, a feleslegben maradt erősen savas $[1-^{14}\text{C}]$ Acetil-CoA-t a gyanta megköti, a kation természetű (quaterner N csoport!) radioaktív acetilkarnitint pedig átengedi. Az átfolyó eluátum radioaktivitását mérjük. Látható, hogy ezen módszer, csakúgy mint a többi enzimatisz analízis, a szabad karnitint méri. A rövid és hosszú láncú karnitinészterek elkülönítése 0.5 N perklórsavban való oldékonyságukon alapszik, mérésük pedig lúgos hidrolízis előtti, illetve az azt követő méréssel és az értékek kivonásával történik. Nevezetesen, a szabad karnitin és észterei 8 szénatomos lánchosszúságig oldódnak 0.5 N perklórsavban, a hosszúlancú karnitinészterek pedig nem. A fehérjementes semlegesített perklórsavas felülúszó egy részében meghatározzuk a karnitint, ez adja a szabad karnitin értéket, majd a másik részét lúggal elhidrolizáljuk és karnitint meghatározva a savolható össz karnitin értéket kapjuk. A kettő különbsége a rövidláncú acilkarnitin. A kicsapott fehérjével együtt az üledékben maradt hosszúlancú karnitin észtereket (főleg palmitoil- és oleil-karnitin) szintén lúgos hidrolízissel alakítjuk szabad karnitinné és így határozzuk meg (33). Munkám során össz karnitin értéken a három frakció összegét értem.

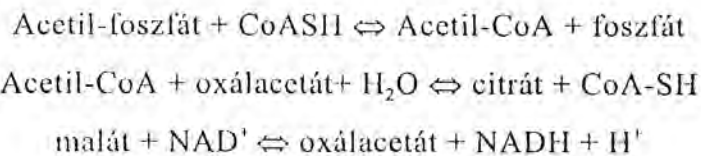
2./ α -Glutamát (Glu) és α -KG meghatározása. Nevezett szubsztrátokat semlegesített perklórsavas máj extraktumból glutamát dehidrogenáz enzim segítségével, standard enzimatisz analízissel határoztuk meg, amely a NADH/NAD⁺ átalakulás fotométerrel való követésén alapult. Elve a következő:



Méréskor a reakció irányának megválasztásával mértük vagy az α -KG-t (34) vagy a Glu-t (35).

3./ Butirobetain meghatározás. Előzőekben leírt módszerrel történt (36). Röviden, a máj semlegesített perklórsavas extraktumához nyomjelzés céljából körülbelül 100 000 cpm aktivitású [3 H]butirobetaint adtunk (ez molekulárisan elhanyagolható mennyiségű Bu molekulát jelentett). Az extraktumot dupla gyantás kis oszlopon tisztítottuk, HPLC oszlopon a karnitint és a Bu-t elválasztottuk (lásd alább) a radioaktivitás követésével. Az egybegyűjtött radioaktív frakciókat vakum alatti centrifugálással (Speed-VAC apparátus) bepároltuk, patkánymájból izolált Bu-hidroxiláz enzim segítségével karnitinné alakítottuk, majd újabb bepárlás után a mintában karnitint határoztunk meg, mérve ezáltal a Bu tartalmat. A mintában maradt esetleges eredeti karnitint Bu-hidroxiláz enzim nélküli kontroll segítségével szűrtük ki. A Bu kinyerése 80-85 % közötti volt, amit a radioaktivitás követésével állapítottunk meg, és az eredeti Bu koncentráció megadásánál korrekcióba vettünk.

4./ A CoASH és acetyl-CoA meghatározás katalitikus módszerrel történt foszfortranszacetiláz enzim segítségével (37). A módszer elve a következő:



A NADH képződése, amelyet a 340 nm-nél mért extinkció növekedésével lehet követni, arányos a CoA és acetyl-CoA mennyiségével. A mérés ditioeritritol (DTE) jelenlétében történik, ami növeli a reakciórátát. A szabad- illetve az acetyl-CoA elkülönítése a minta NEM-del való előkezelésével történik mely a szabad CoA-val reagál.

5./Az aszkorbinsav meghatározása a máj metafoszforsavas extraktumában történt UV spektrofotometriás módszerrel, az aszkorbinsav oxidációját jelző redoxfesték (diklórfenol-indofenol) segítségével.

Folyadékkromatográfiás (HPLC) elválasztás

A Bu és a karnitin elválasztását két célból végeztük. Egyik a fent kifejtett Bu meghatározás volt, amikor is a mitához nyomjelzőként utólag adott [3 H]Bu

alapján, mintegy mikropreparációval izoláltuk a mintából a Bu tartalmat. A másik esetben az állatok a [^3H]Bu-t *in vivo* kapták és a Bu karnitintől való elválasztása 30 perc múlva történt. Ez utóbbi esetben tehát mindkét frakció radioaktív volt és az elválasztást a Bu \rightarrow karnitin *in vivo* átalakulás sebességének megítélése céljából végeztük.

A minta feldolgozása és az elválasztás alapvetően a korábban leírtak szerint történt (38). A savas extraktumot vagy az egész mintát lúgosan hidrolizáltuk majd semlegesítettük. 1.0 ml plazmából vagy 0.5 g szövetből való extraktumot feltettünk egy 0.5 cm \times 4 cm Dowex 50 \times 8 H⁺ fázisban lévő kationcserélő oszlopra. Az oszlopot 2.0 ml vízzel mostuk, az eluátumot eldobjuk. Az oszlop a pozitív töltésű trimetilaminokat, így a számunkra fontos anyagokat megkötötte. Ezután az oszlopot áthelyezzük egy másik ugyanilyen méretű oszlop fölé, mely 0.5 cm \times 4 cm Dowex 1 \times 8 OH⁻ fázisban lévő anioncserélőt tartalmaz. A felső oszlopra 3.0 ml 2.4 N NH₄OH-ot teszünk és ettől kezdve az eluátumot gyűjtjük az alsó oszlopból. (Az NH₄ fázisba átalakuló felső kationcserélő gyanta a számunkra érdekes anyagokat nem köti meg). Végül izolálendő anyagainkat NH₄ OH tartalmú sómentes vizes oldatban kapjuk, melyet levegő fuvatással szárazra párolunk, így az NH₄OH eltávozik. A kinyert anyag fő komponensei a trimetilaminok (karnitin, butirobetain), trimetillizin, metilhisztidin, poliaminok és néhány nem azonosított vegyület.

A HPLC segítségével történő elválasztás reverz fázisu ion pár elven alapult. Egy komputerizált HPLC rendszert használtunk (TOSOH, TSK-611), amely egy alacsony nyomású gradiens pumpából és egy UV/VIZ detectorból állt. Az oszlop SupelcosilTM LC-18 volt 5 μm részecske mérettel (Supelco). Az eluens pH 2.5 Na-foszfát volt 5 mM 1-heptánszulfonsav ion-pár reagenssel. Az eluens 7.5% (v/v) metanolt tartalmazott.

Gáz kromatográf tömegspektrográf (GS-MS) analízis

A patkány májának semlegesített perklórsavas extraktumát (250 mg szövet 2.0 ml-ben) H⁺ formában lévő erős kationcserélő gyantán tisztítottuk és a FEAK-ot némi módosítással a leírtak szerint detektáltuk (39). Röviden, 1.0 ml máj extraktumot tettünk

fel egy 0.5 X 4 cm Dowex 50W x 8 (200-400 mesh, H⁺ fázis) oszlopra, amely a kationokat, így az összes karnitint és acilkarnitint megkötötte. Az oszlopot mostuk 10.0 ml 8:1 aceton:víz eleggyel a szabad FES eltávolítása végett. Ezután az oszlopról a karnitineket 5.0 ml 2 N ammonium hidroxiddal eluáltuk, amely a karnitin észtereket helyben elhidrolizálta, az NH⁺ ionok pedig a karnitint a gyantáról leszorították. Így a FES karnitin észter, a PEAK is elhidrolizált, és a szabad FES az oszlop eluátumában megjelent. Lényegében tehát a kation-kötött FES-t detektáltuk, amit joggal tekinthetünk (mind az eredményekből kitűnik, lásd 6. Táblázat), karnitin észternek. A karnitinhez kötött acil-csoportokat, így a FES-t metil észter formájában detektáltuk a GS-MS készülékkel. A derivatizáció 100 µl ml metanol·HCl ban, ledugaszolt üvegsőben történt 1 órán keresztül 60^o C-on való hevítéssel, amit 1 N NaOH-dal való semlegesítés és centrifugálás követett. Rendszerint 1 vagy 2 µl tiszta felülúszót injektáltunk a készülék the "splitless" üzemmódban levő injektorába.

A GC-MS készülék Shimadzu QP2000 elektron ionizáló készülék volt quadropol detektorral. A 25 m hosszú Hewlet-Packard 19091B-005 0.2mm-es kapilláris oszlop 0.11 µm vastag Ph-Me Silicon-nal volt bevonva. Az injektor hőmérséklet 280^o C volt, a kemence hőmérséklet programja a következő volt: 72^o 2 percig, 72-280^o C között nőtt 15^o C/perc sebességgel, végül a 280^o C-ot még tartotta 3 percig. A hordozó He gáz áramlási sebessége 1.0 ml/perc volt.

EREDMÉNYEK

I. A karnitin bioszintézisének gátlása Valproáttal és a gátlás mechanizmusa.

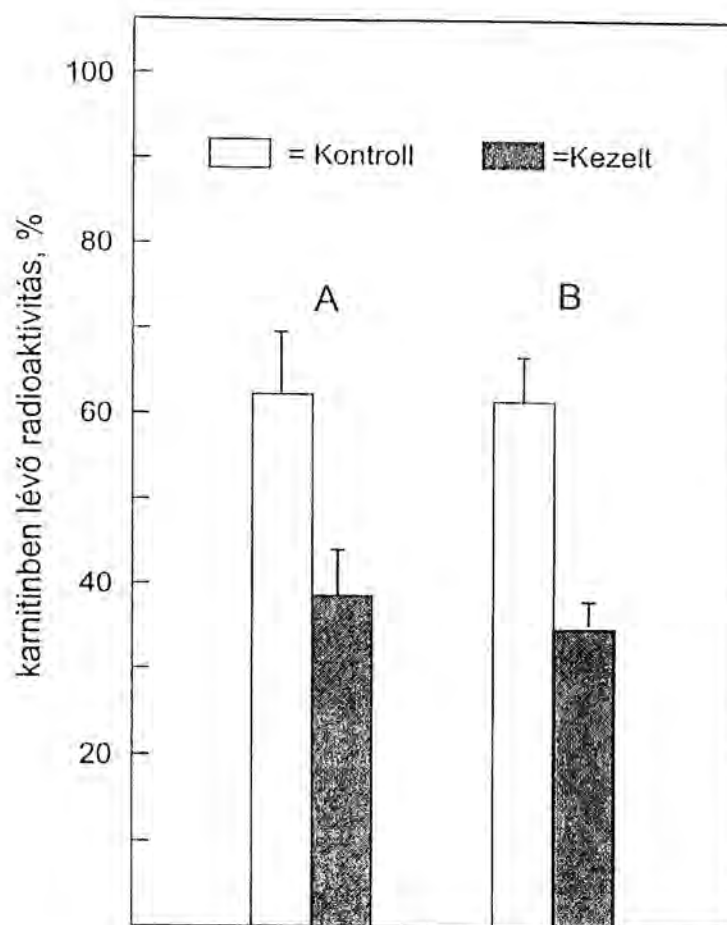
I.1. A karnitin szintézis gátlásának bizonyítása

A karnitin bioszintézis utolsó lépését katalizáló butirobetain hidroxiláz enzim patkányban kizárólag a májban fordul elő. Ezért az enzimen keresztül történő fluxus sebességének mérése megbízható adatot szolgáltat a szervezet karnitin ellátásáról. A kontroll állatokban 30 perccel a [³H] Bu adást követően az injektált radioaktivitás 30-35%-át találtuk a májban, ennek általában 60-70%-a jelent meg karnitinben. Ezek az értékek megegyeztek a korábban közölt adatokkal (40). (Az injektált Bu nagy specifikus aktivitásának következtében ez nyomnyi mennyiségnek tekinthető.)

Mint látható a Valproát kezelés jelentősen csökkentette a [³H]Bu átalakulását karnitinné. (2. ábra)

1.2 mmol/kg dózisonál 63.2±1.5 %-ról 39.2±1.11 %-ra, (átlag±SEM), a 2.4 mmol/kg dózis esetében pedig 61.6±5.2 %-ról 34.8±3.8 %-ra csökkent a karnitinben talált radioaktivitás. Az eredményekből kitűnik, hogy az 1.2 mmol/kg adag elérte a maximális hatást, ezért a további kísérletekben ezt a dózist használtuk ami a rágsálókkal végzett kísérletekben használt dózistartományba esik (23).

2. Ábra. A Valproát hatása nyomjelző mennyiségű radioaktív butirobetain karnitinné való átalakulására patkány májában.

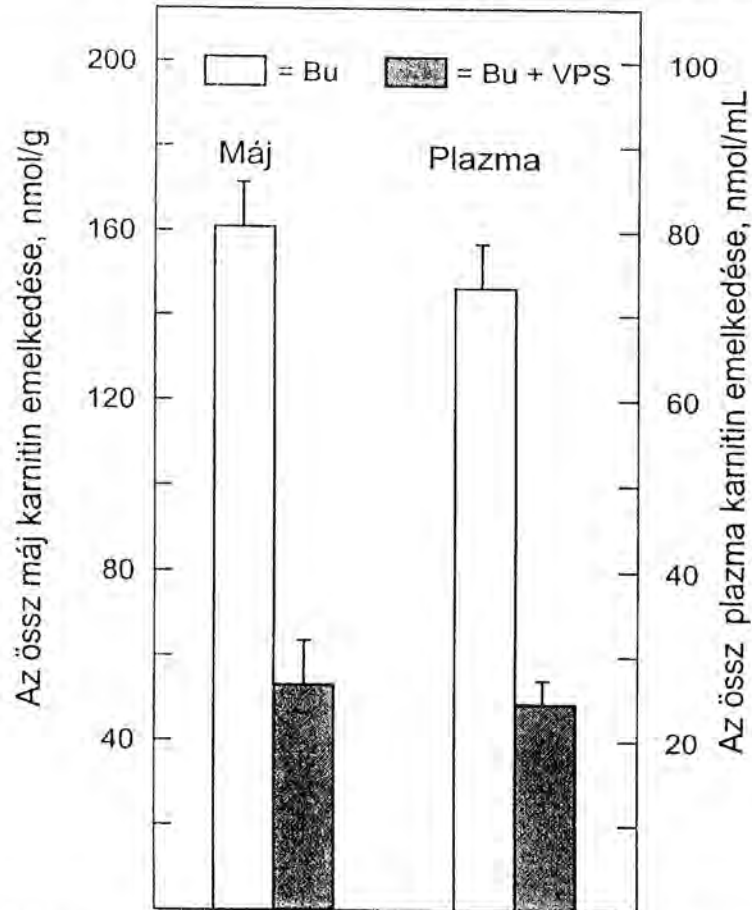


Az állatok 1.2 mmol/kg (A) vagy 2.4 mmol/kg (B) Valproátot kaptak. 30 perc múlva az összes állatnak 1.5×10^7 cpm [^3H]Butirobetaint injektáltunk. 30 perccel az izotóp adminisztrációt követően (60 perccel a Valproát adását követően) az állatokat leöltük és 0.5 g májat analizáltunk a radioaktivitás megoszlásra butirobetain és karnitin között. Az oszlopok a kinyert össz radioaktivitás karnitinben talált százalékát jelzik (átlag \pm SEM) 5(A) illetve 4 (B) állat esetében.

A következőkben a radioaktív nyomjelzéssel nyert eredmények és következtetések megerősítése végett a kísérletet úgy ismételtük meg, hogy jelöletlen, molekulárisan terhelő mennyiségű Bu-t adtunk az állatoknak, amely ismert módon gyorsan karnitinné alakul, jelentősen növelve ezáltal a karnitin szintet az állatok szöveteiben (41). Megnéztük a Valproát hatását a Bu által okozott össz karnitin szint növekedésre patkányok májában és plazmájában.

(Ez esetben tehát nem radioaktivitást mértünk, hanem enzimatikus analízist végeztünk a karnitin szintek mérése céljából). Az állatok kezelésének protokollja ugyanaz volt mint az előző kísérletben (2. Ábra), azzal a különbséggel, hogy a radioaktív Bu helyett 200 μ M (30 mg) Bu-t injektáltunk (3. ábra).

3. Ábra. A Valproát hatása terheléssel adott jelöletlen butirobetain karnitin szintet emelő hatására patkány májában és plazmájában.



A kezelt állatok 1.2 mmol/kg Valproátot (VPS) kaptak. 30 perc múlva az összes ábrán feltüntetett állatnak 200 μ mol jelöletlen butirobetaint (Bu) injektáltunk. 30 perccel a Bu adminisztrációt követően (60 perccel a VPS adását követően) az állatokat leöltük, májukban és plazmájukban az össz karnitint meghatároztuk. Az oszlopok a Bu hatására bekövetkezett karnitin emelkedést (átlag \pm SEM) mutatják, értéküket a következő módon számoltuk ki: A minden kezelés nélküli ("abszolút" kontroll, nincs ábrázolva) csoport karnitin értékeit (májban 181 nmol/g, plazmában 35.2 nmol/mL), levontuk a csak Bu-t kapott csoport értékeiből, Bu csoport. A csak VPS-t kapott csoport értékeit (májban 152 nmol/g, plazmában 30.8 nmol/mL), amelyeket szintén nem ábrázoltunk, levontuk a Bu-t és VPS-t kapott csoport értékeiből, Bu + VPS csoport.

A nem jelzett Bu megnövelte a máj össz karnitin szintjét 161 ± 15.2 nmollal grammonként. Ez a növekedés jelentősen, a 161 ± 15.2 nmol/g- értékről 53.2 ± 5.11 nmol/g-ra csökkent a Bu plusz VPS kezelt csoportban. A megfelelő értékek a szérumban 73.2 ± 4.50 nmol/ml (Bu csoport) illetve 24.4 ± 2.24 nmol/ml (Bu plusz VPS csoport) voltak.

Megvizsgáltuk a máj és szérum karnitin és butirobetain szintek alakulását VPS kezelés hatására (I,II Táblázat). Ez esetben tehát nem egy beadott anyag (jelölt vagy jelöletlen Bu) átalakulását mértük, hanem az endogen szubsztrátokból folyamatosan történő karnitin szintézis változását. Mint látható, VPS kezelés hatására a totál és szabad karnitin mennyisége csökkent a májban (I. Táblázat) és a plazmában (II. Táblázat) egyaránt. Ezen megfigyelés megerősíti a korábbiakat, tehát a VPS 1 óráig tartó hatása alatt is mérhető volt a karnitin szintézis sebességének csökkenése. Ugyanakkor az össz karnitin pool-on belül némi eltolódás következett be, a savoldható rövid láncú észterek mennyisége növekedett, ami az irodalmi adatokkal összevetve a zsírsavoxidáció gátlásából következik. A hosszú láncú karnitínészterek mennyiségében nem volt változás.

1.Táblázat. Valproát hatása a máj karnitin és butirobetain tartalmára patkányban

Állatok (No.)	Butirobetain	Karnitin			
		Össz	Szabad nmol/g	RLK	HLK
Kontroll (5)	5.01 ± 0.71	181.3 ± 11.8	109 ± 9.20	68.9 ± 7.02	3.26 ± 0.91
Kezelt (5)	8.22 ⁺ ± 0.82	152.0* ± 8.11	65.9 ⁺ ± 4.12	82.9 ± 7.11	3.30 ± 0.42

Az állatok 1.2 mmol per kg Valproátot kaptak i.p. 60 perccel leölésük előtt. Az átlag \pm SEM értékek a zárójelben feltüntetett számú állatra vonatkoznak. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest: *P<0.02, ⁺P<0.01. Rövidítések: RLK: rövid láncú acilkarnitin; HLK: hosszú láncú acilkarnitin.

2.Táblázat. Valproát hatása a plazma karnitin tartalmára patkányban

Állatok (No.)	Össz	Szabad	Karnitin	
			RIK	H1K
nmol/ml				
Kontroll (5)	35.2 ±1.24	23.1 ±2.85	11.1 ±2.20	1.00 ±0.12
Kezelt (5)	30.8 ±3.11	15.8* ±1.12	14.1 ±2.65	0.89 ±0.05

Az állatok azonosak voltak az 1. Táblázatban leírt kísérlethez használtakkal. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest: * $P < 0.02$. Rövidítések: RIK: rövid láncú acilkarnitin; H1K: hosszú láncú acilkarnitin.

Figyelemreméltó, hogy a Bu szint szignifikáns növekedést mutatott ($p < 0.01$) 5.01 nmol/g-ról 8.12 nmol/g-ra VPS kezelt állatokban. A szintézis során a Bu-hidroxiláz előtt lévő szubsztrát, a Bu felszaporodása, az előző kísérletek eredményeivel összhangban, az enzimen keresztül történő fluxus gátlását mutatja.

1.2. A Valproát okozta karnitin szintézis gátlás mechanizmusa

A gátlás mechanizmusát vizsgálva a legkézenfekvőbb elképzelést a kísérletek elején el kellett vetnünk, azt találtuk ugyanis hogy a VPS direkt nem gátolja az izolált Bu-hidroxiláz enzimet. Ezek után a hatásnak közvetett módját, feltehetően egy olyan metabolit szintjének a befolyásolását kellett feltételeznünk, amely valami módon kapcsolatos a karnitin bioszintézisével, illetve a szintézishez szükséges kofaktorokkal.

Mivel a VPS csökkenti a szabad CoA szinteket azáltal, hogy a VPS-CoA észtert képez, felmerült a lehetősége, hogy a VPS szabad és acetil CoA-t kimerítő hatása szerepet játszhat a Bu átalakulás csökkentésében közvetett módon. Hogy teszteljük ezt az elképzelést, összehasonlítottuk néhány szer hatását a máj CoA szintekre és a butirobetain-karnitin átalakulásra (III. táblázat).

III. Táblázat. Valproát, Benzoésav és Pivalinsav hatása a máj CoA tartalmára és a butirobetain karnitinné való átalakulására patkányban.

Kísérlet	Acetil-CoA	Szabad CoA	Radioaktivitás megoszlása
		nmol/g	% karnitínben
Valproát			
Kontroll (5)	41.1±5.30	50.6±5.41	68.7
Kezelt (4)	9.9±1.11*	14.4±0.81*	40.9*
Benzoésav			
Kontroll (4)	50.2±6.42	46.5±5.01	69.3
Kezelt (4)	48.2±5.22	44.2±6.32	49.3*
Pivalinsav			
Kontroll (5)	45.3±3.22	12.8±1.51	70.1
Kezelt (4)	34.2±4.31*	3.8±0.81*	68.7

Az ágenseket 1.2 mmol per kg dózisban i.p. kapták az állatok 1 órával leölésük előtt. Meghatároztuk a CoA, acetil-CoA szinteket és a radioaktivitás megoszlását. Az átlag+SEM értékek a zárójelben feltüntetett számú állatra vonatkoznak. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest: *P < 0.01.

A VPS csökkentette a szabad és acetil-CoA szintet és a Bu átalakulást is. A pivalinsav, amely szintén csökkentette a CoA szinteket, nem gátolta a Bu konverzióját. Ezzel szemben a benzoésav, amely nem változtatta a CoA szinteket, gátolta a Bu átalakulást. Együttvéve ez arra utal, hogy a gátlás közvetetten sem a CoA szintek befolyásolásával történik. (Számos más, másodlagos karnitin deficienciában ürülő szerves sav hatását teszteltük a butirobetain→karnitin átalakulásra lehetséges gátló hatás szempontjából negatív eredménnyel.)

A következő kísérletekben azt vizsgáltuk, befolyásolja-e a Valproát a butirobetain-hidroxiláz valamelyik kofaktorának szintjét. (IV. Táblázat). A következtetések megerősítése végett egyidejűleg a másik két referencia vegyületnek, a pivalinsavnak és a benzoésavnak a hatását is vizsgáltuk,

amelyeknek a Bu→karnitin átalakulásra való hatását az előző kísérletből (III. Táblázat) már ismertük.

IV. Táblázat. Valproát, Benzoésav és Pivalinsav hatása a máj Aszkorbinsav, α -Ketoglutarát és L-Glutamát tartalmára patkányban.

Kísérlet	Aszkorbinsav $\mu\text{g/g}$	α -Ketoglutarát nmol/g	L-Glutamát $\mu\text{mol/g}$
Kontroll (8)	172 \pm 6.25	73.5 \pm 2.93	2.73 \pm 0.71
Valproát			
30 min (8)	183 \pm 17.2	52.4 \pm 3.52*	1.14 \pm 0.03 ⁺
60 min (8)	168 \pm 25.0	52.9 \pm 2.2*	1.24 \pm 0.07 ⁺
Benzoésav (6)	171 \pm 21.4	62.7 \pm 1.10 [‡]	2.19 \pm 0.03 [‡]
Pivalinsav (7)	165 \pm 11.2	70.1 \pm 5.11	2.51 \pm 0.20

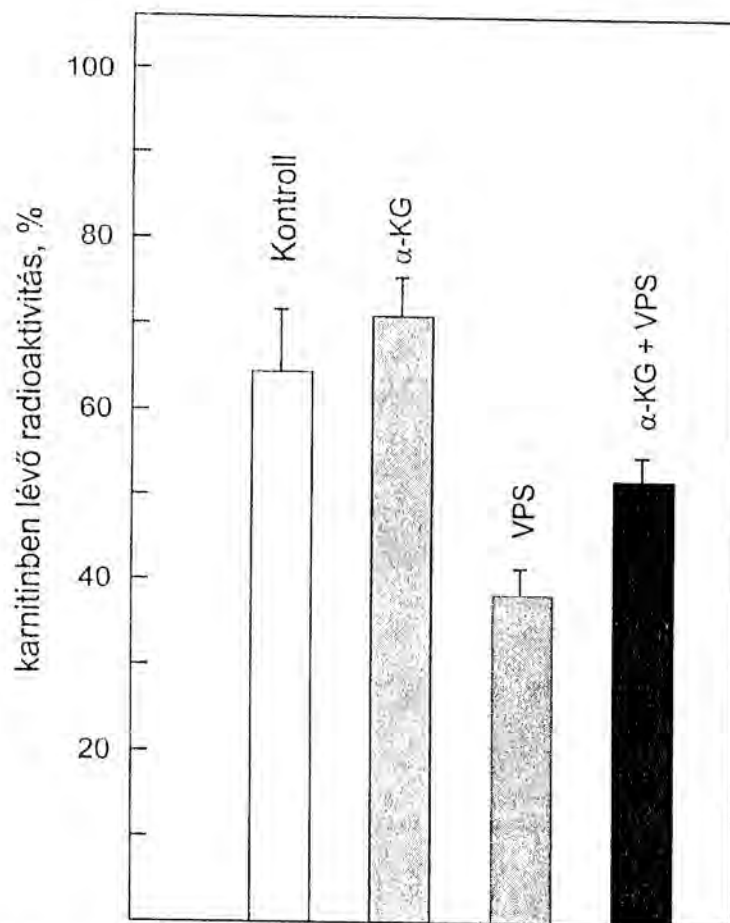
Az állatok 1.2 mmol/kg dózist kaptak az egyes komponensekből i.p. 60 perccel leölésük előtt (eltérő időintervallum jelezve). Az átlag+SEM értékek a zárójelben jelzett számú állatra vonatkoznak. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest: [‡]P<0.05, *P<0.02, ⁺P<0.01.

A IV Táblázatból látható, hogy a Valproát hatására az α -KG szint a májban szignifikánsan csökkent (73.5 nmol/g-ról 52.9 nmol/g-ra). Az α -KG szintben talált csökkenés alapján érdemesnek látszott megmérni partner szubsztrátjának, az L-Glutamát (Glu) a szintjét is. A Glu szintben még jelentősebb volt a csökkenés (2.73 $\mu\text{mol/g}$ -ról 1.24 $\mu\text{mol/g}$ -ra), mint az α -KG esetében. Az aszkorbinsav szintjét egyik metabolit sem befolyásolta.

A következtetés levonásához nagyon figyelemreméltó a benzoésav viselkedése. A benzoésav gyengébben ugyan, de szintén szignifikánsan csökkentette az Glu és α -KG szinteket, valamint a III. Táblázat tanúsága szerint a Bu→karnitin átalakulást is. Ezek alapján nagyon valószínűnek tűnik, hogy az α -KG szintet csökkentő ágensek, a karnitin szintézis ismert mechanizmusából következően, gátolják a butirobetain hidroxiláz enzimen keresztül történő fluxust, és így a karnitin bioszintézisét.

A kapott eredmény további megerősítésére a következő kísérletben azt vizsgáltuk, vajon az α -ketoglutarát kivédi-e a Valproát butirobetain átalakulásra gyakorolt hatását (4. ábra).

4.Ábra. Az α -ketoglutarát hatása nyomjelző mennyiségű radioaktív butirobetain karnitinné való átalakulására patkány májában.



A kísérleti körülmények megegyeztek a 2/A ábrán leírtakkal a jelzett csoportok kivételével, ahol 0.3 mmol α -Ketoglutarátot adtunk a [3 H]butirobetainnal együtt. Az oszlopok a kinyert össz radioaktivitás karnitinben talált százalékát jelzik (átlag \pm SEM) 5 állat esetében. Rövidítések: α -KG, α -Ketoglutarát; VPS, Valproát.

A karnitinben talált radioaktivitás 38.8 %-ról 50.8 %-ra növekedett a VPS plusz α -KG csoportban. Érdeemes megjegyezni hogy az α -KG magában is növelte a Bu átalakulást a kontrollban mért 63.7 %-ról 73.7 %-ra (4.ábra α -KG csoport).

A kísérletek alapján igazolva látjuk, hogy a Valproát gátolja a karnitin bioszintézisét a butirobetain-hidroxiláz enzimen keresztül történő fluxus gátlásával, és ezen hatást az enzim egyik koenzimjének, az α -Ketoglutarát szintjének a csökkentésével fejtí ki.

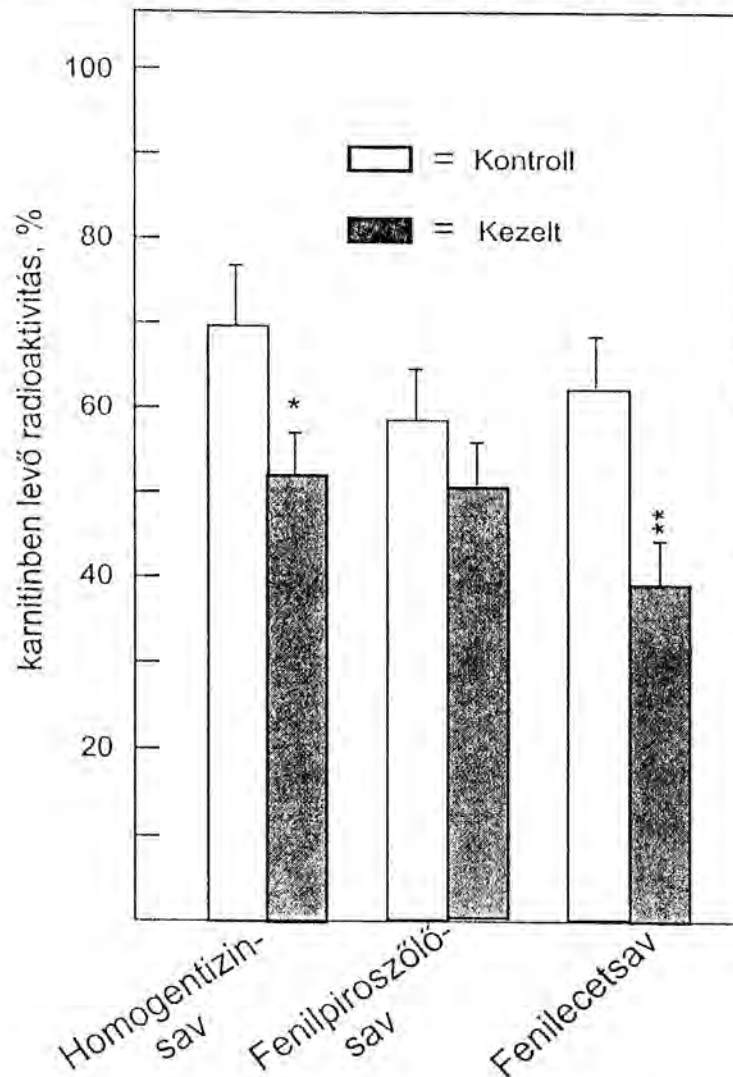
II. A fenilalanin lebontás metabolitjainak hatása a karnitin bioszintézisére

II.1. A gátlást mutató metabolit kiválasztása, a gátlás bizonyítása.

Valproáttal végzett kísérleteink során kiderült, hogy a benzooesav szintén gátolja a butirobetain-karnitin átalakulást. Ez adta az ötletet, hogy megvizsgáljuk néhány, biológiai fontossággal bíró benzooesav analóg aromás vegyület esetleges hatását a karnitin bioszintézisre. A természetes metabolitok között keresve figyelmünk az aromás aminosavak anyageseréjére irányult. A Phe lebontás vizsgálatának jelentőségét, annak humán patológiai vonatkozásait a bevezetésben már hangsúlyoztuk. A következő kísérletben a fenilalanin lebontás három intermedierjét, a fenilpiruvátot, fenilecetsavat és homogentizinsavat teszteltük (5. ábra).

A három metabolit közül leghatásosabbnak a fenilecetsav bizonyult, mely 2 mmol/kg egyszeri i.p. dózisban alkalmazva, 60 perc múlva a BU karnitinné történő átalakulását 62.9%-ról 43.5%-ra csökkentette. Azonos körülmények között és azonos mennyiségben kisebb mértékben volt hatásos a fenilpiruvát (50.5% a kontrollban talált 57.6%-kal szemben) és a homogentizinsav (51.6% 62.9%-ról a kontrollban). Ezért a további tanulmányokhoz a fenilecetsavat használtuk.

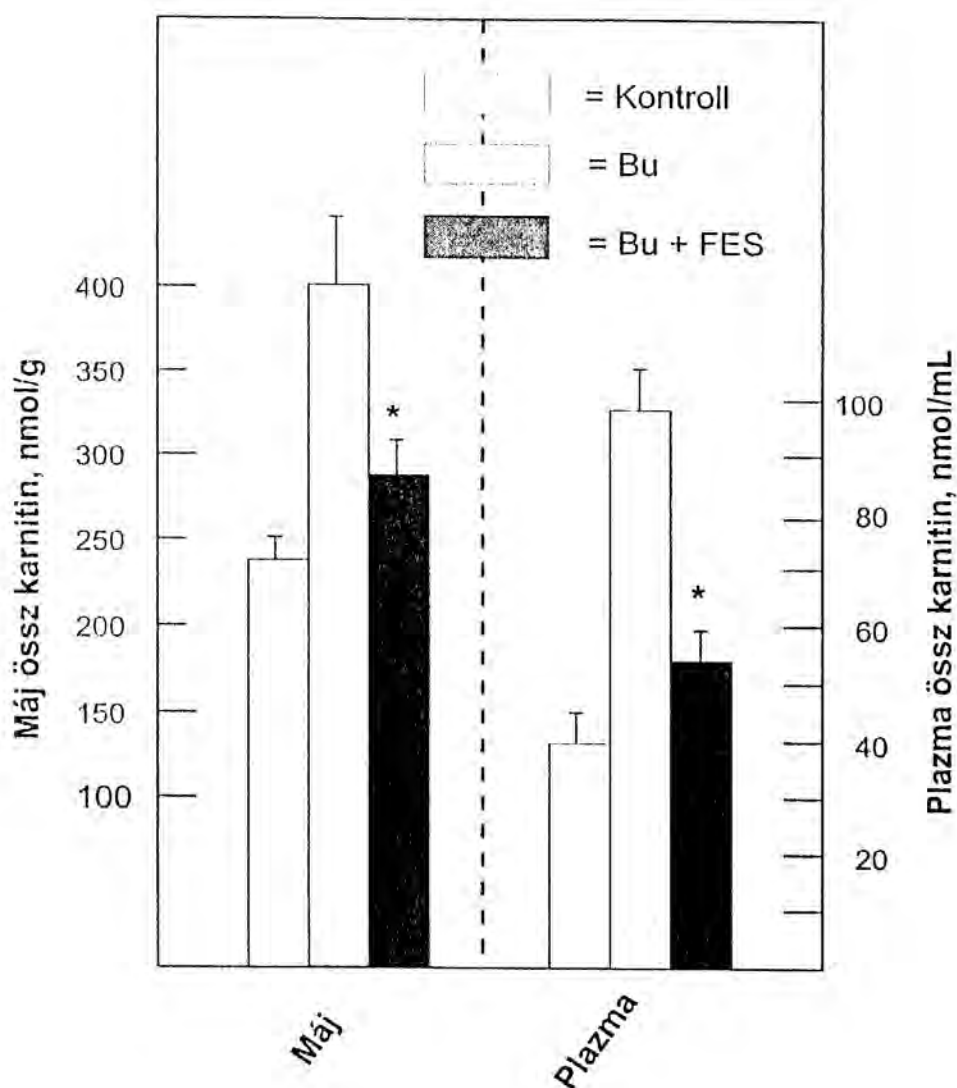
5. Ábra. A fenilalanin lebontás egyes metabolitjainak hatása nyomjelző mennyiségű radioaktív butirobetain karnitinné való átalakulására patkány májában.



Az állatok 2 mmol/kg mennyiséget kaptak a feltüntetett vegyületekből. 30 perc múlva az összes állatnak 1.5×10^7 cpm [^3H]Butirobetaint injektáltunk. 30 perccel az izotóp adminisztrációt követően (60 perccel nevezett vegyületek adása után) az állatokat leöltük és 0.5 g májat analizáltunk radioaktivitás megoszlásra a butirobetain és karnitin között. Az oszlopok a kinyert össz radioaktivitás karnitínben talált százalékát jelzik (átlag \pm SEM) 8 állat esetében.

A FES esetében (a VPS kísérlethez hasonlóan) a Bu karnitinné való átalakulásának gátlását "kézzelfoghatóan" azáltal bizonyítottuk, hogy demonstráltuk, mennyiségileg jelentős jelöletlen Bu karnitin emelő hatását is gátolja (6. Ábra).

6. Ábra. A Fenilecetsav hatása terheléses mennyiségben adott jelöletlen butirobetain karnitin szintet emelő hatására patkány májában.



A Fenilecetsav-val (FES) kezelt állatok (Bu+FES csoport) 2 mmol/kg FES-t kaptak. 30 perc múlva a Bu és a Bu+FES csoport 200 μ mol jelöletlen butirobetaint (Bu) kapott. 30 perccel a Bu adminisztrációt követően (60 perccel a FES adását követően) az állatokat leöltük, májukban és plazmájukban az össz karnitint meghatároztuk. Az oszlopok a karnitin szinteket jelzik (átlag \pm SEM) 4 vagy 5 állat esetében. * $P < 0.01$ ha az értékeket a csak Bu-t kapott csoporthoz hasonlítjuk. Rövidítések: FES, fenilecetsav; Bu: butirobetain.

Látható, hogy a FES a Bu hatására bekövetkezett karnitin szint emelkedést a VPS-hez hasonlóan igen jelentős mértékben gátolta.

A következőkben megvizsgáltuk a FES 1 órás hatását az állatok karnitin szintjeinek alakulására, vizsgálva ezáltal az endogen előanyagokból való bioszintézisre és az össz karnitinen belül az észter megoszlásra gyakorolt hatást. (V. Táblázat).

V. Táblázat. A fenilecetsav hatása a máj és a plazma karnitin tartalmára patkányban.

Állatok (No.)	Máj karnitin (nmol/g)			Plazma karnitin (nmol/mL)		
	Össz	Szabad	RLK	Össz	Szabad	RLK
Kontroll (5)	292 ±15.1	186 ±18.2	82.2 ±8.11	55.2 ±3.50	36.6 ±4.11	13.6 ±2.01
Kezelt (5)	282 ±9.86	*99 ±10.1	*150 ±10.2	*41.6 ±2.21	24.1 ±3.22	13.2 ±1.41

Az állatok 1.2 mmol/kg fenilecetsavat kaptak i.p. 60 perccel leölésük előtt. Az átlag±SEM értékek a zárójelben jelzett számú állatra vonatkoznak. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest: *P < 0.01. Rövidítések: RLK: rövid láncú acilkarnitin.

A plazmában az össz és a szabad karnitin mennyisége is csökkent, amíg az észterek részvételi aránya nem változott. A máj össz karnitin értéke 292 nmol/g-ról csak 282 nmol/g értékre csökkent, lényegében nem változott szignifikánsan. Tehát a karnitin bioszintézisének gátlása az endogén prekursorokból (a vizsgált 1 óráig tartó hatás alatt) nem volt olyan kifejezett mint a VPS esetén, csak a plazmában tükrözötte az össz karnitin szintjének csökkenése.

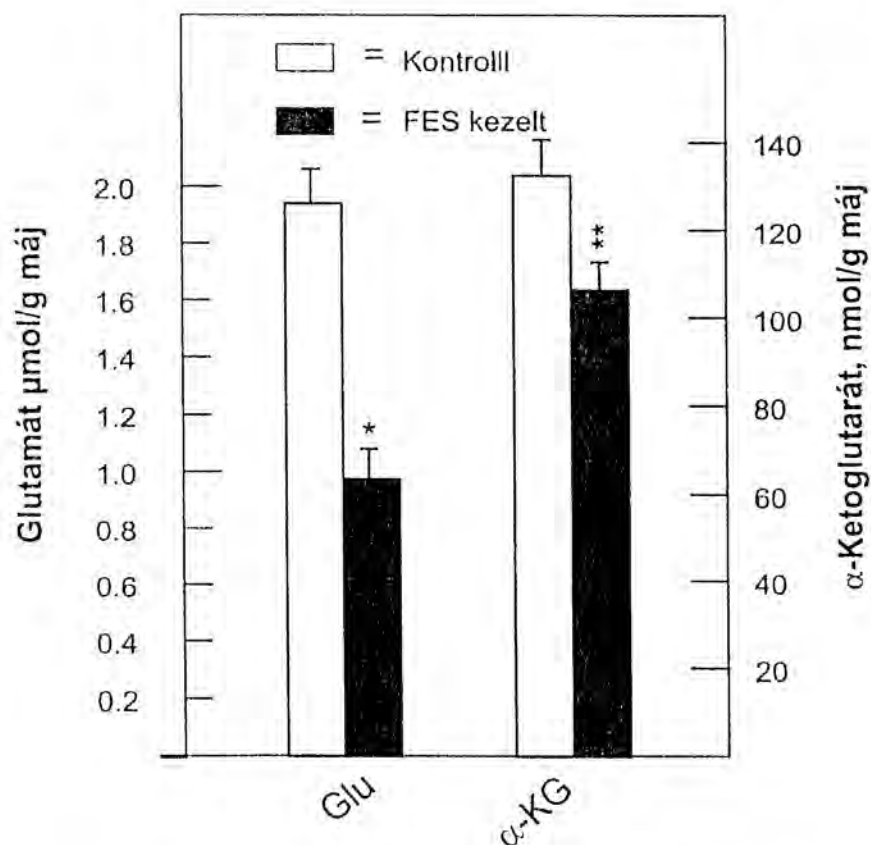
Ugyanakkor a májban az észteresítés fokában következett be lényeges változás FES hatására: a rövid láncú karnitineszterek mennyisége 82.5 nmol/g kontroll értékről 151.2 nmol/g-ra emelkedett a szabad karnitin rovására, amelynek szintje 186 nmol/g-ról 99 nmol/g-ra csökkent. Az észter frakció ezen emelkedésének oka nem teljesen világos, feltehetően a rövidláncú zsírsavak és CoA észterek felszaporodnak és egy részük karnitinre kerül át, karnitin észtert képezve. A jelentősen emelkedett észter frakció felveti a kérdést, hogy esetleg

maga a FES képez karnitin észtert. Ezen kérdés vizsgálatára, amely munkám lényeges részét képezi, a II.3 pontban térek vissza.

II.2. A Fenilecetsav okozta karnitin szintézis gátlás mechanizmusa

A szintézis gátlás mechanizmusának kiderítésére megvizsgáltuk a butirobetain hidroxiláz kofaktorainak mennyiségében történt esetleges változást FES hatására, hasonlóképpen a Valproát esetéhez. Az α -KG és a Glu szintre való hatás vizsgálatát az is indokolja, hogy a benzooesav, amely analóg vegyület lévén a FES vizsgálatára indított bennünket, szintén csökkentette ezen metabolitok szintjét (IV. Táblázat). A FES hatását ugyanolyan körülmények között a 7. Ábra mutatja

7. Ábra. A Fenilecetsav hatása az L-Glutamatra és α -Ketoglutaratra patkány májában.



Az állatok 2 mmol/kg Fenilecetsavat kaptak. 60 perc múlva az állatokat leöltük és májukat analizáltuk. Az oszlopok az L-Glutamát (Glu) és α -Ketoglutarát (α -KG) szinteket (átlag \pm SEM) ábrázolják 5 állat esetében. * $P < .01$; ** $P < .02$.

Mint az ábrán látható, az α -KG szint csökkent 132.6 nmol/g-ról 107.4 nmol/g-ra. A csökkenés a Glu szintben még drasztikusabb volt, 1.78 μ mol/g kontroll értékről 0.86 μ mol/g-ra.

II.3. A Fenacetil-karnitin (FEAK) létének bizonyítása patkány májában

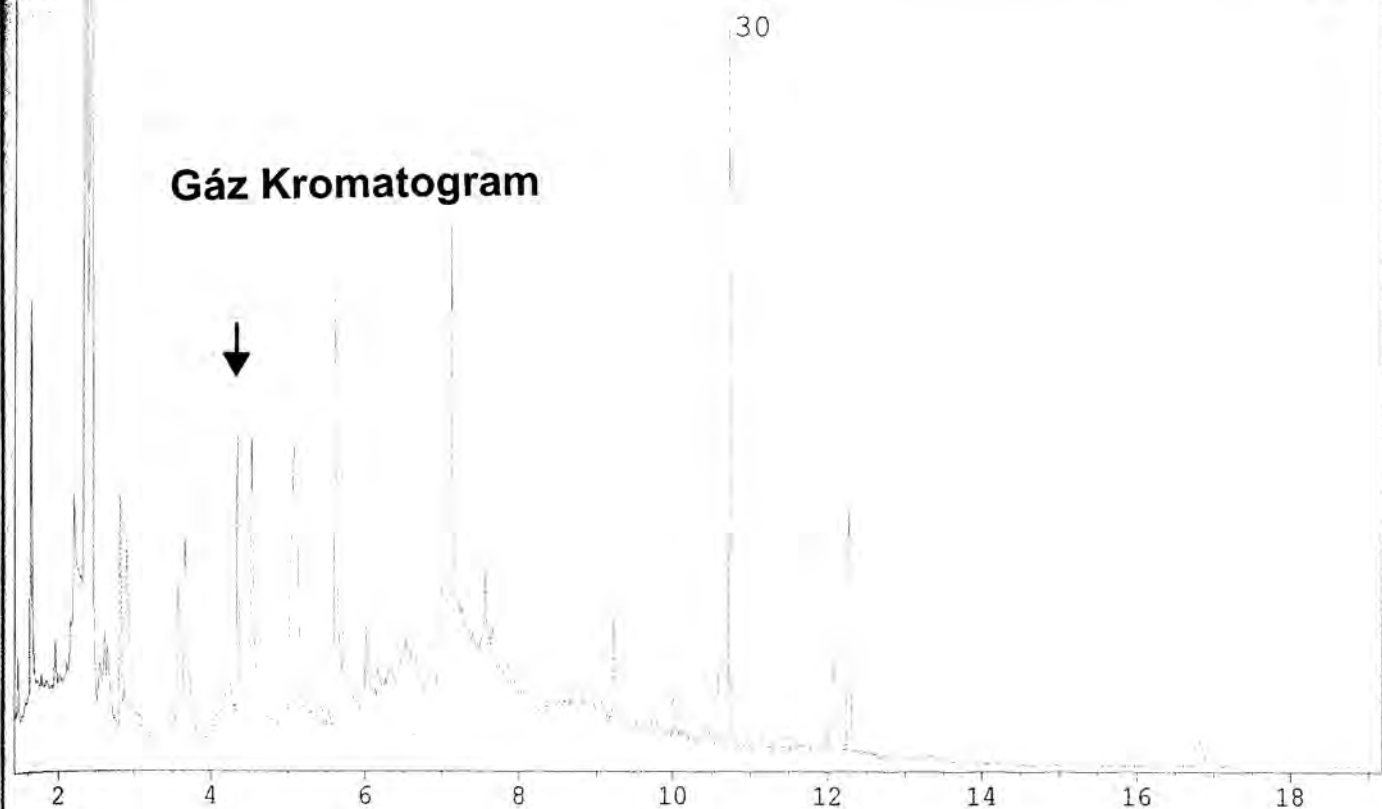
Az V. Táblázat értékelésekor már utaltunk arra, hogy a FES kezelt állatok májában megfigyelt jelentős rövidláncú acilkarnitin növekedés lehetséges, hogy részben FEAK jelenlétének tulajdonítható, amely kémiai tulajdonságai révén (lásd ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK FEJEZET, *Metabolitok analízise*) szintén a rövidláncú karnitin észterek csoportjába kerül.

A kérdés eldöntésére gázkromatográf-tömegspektrográf (GC-MS) módszert alkalmaztunk. A FES-val kezelt patkánymájából gyantán való speciális előkezelés után nyert gázkromatogrammot és a FES csúcs tömegspektrumát mutatja a 8. Ábra.

Az ábra felső része a gázkromatogrammot (Total Ion Chromatogramm, TIC) mutatja, amelyen nyíllal jelöltük a FES helyét. Az összes detektált anyag, így a FES is eredetileg kationhoz kötött sav, vagy önmaga kation lehetett. A részletes magyarázatot illetően az ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK fejezet *Gáz kromatográf tömegspektrográf (GS-MS) analízis* részére utalunk. Az ábra alsó része a TIC-ből kiválasztott FES tömegspektrumát mutatja. A két fő tömegszám, 150 és 91 eredetét szintén az ábra mutatja. (Műtermék képződését kizárandó, elvégeztük azt a kontroll kísérletet, hogy a kezeletlen patkány májának extraktumához utólag tettük hozzá a FES-t. Ekkor FES-t a gyanta ammóniás eluátumában nem detektáltunk, mivel a szabadon maradt FES-t előzőleg eluáltuk).

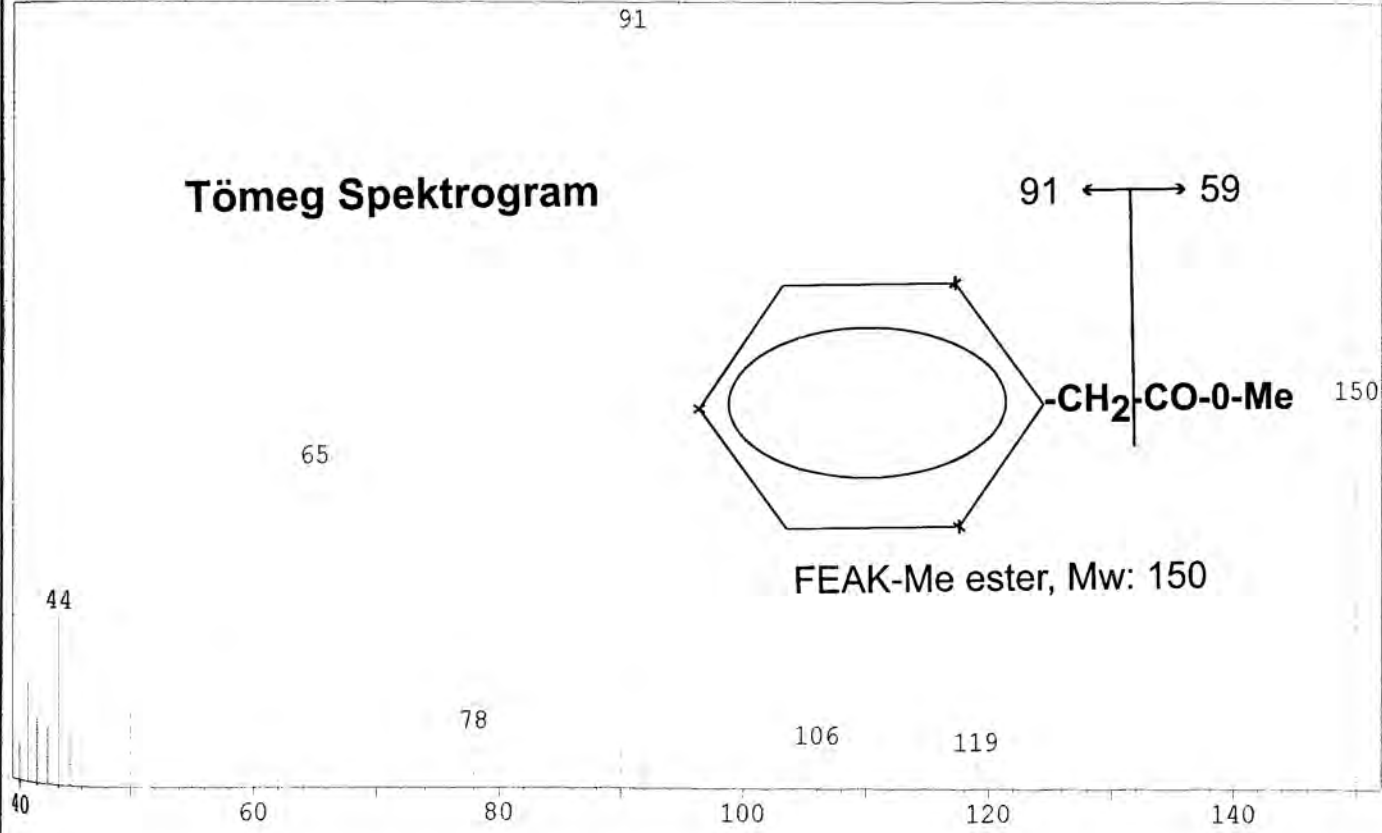
TIC

Gáz Kromatogram



Scan # : 190
 Mass Peak # : 27 Ret. Time : 4.350
 Base Peak : 91.00 (7820)

Tömeg Spektrogram



8. Ábra. A fenilecetsav elválasztása GC és detektálása MS segítségével

Mint a módszertani leírásból következik, a jelenleg rendelkezésünkre álló elektron ionizáló GC-MS készülékkel a FEAK-t csak közvetetten tudtuk kimutatni, lényegében azt mondhatjuk, hogy a FES kationhoz, nagy valószínűséggel karnitinhez kötődött. Bizonyítandó, hogy a kation valóban karnitin volt végeztük a következő kísérletet, amelyben a patkány máj karnitin szintjét Bu előkezeléssel jelentősen megemeltük, és vizsgáltuk, ez esetben mennyi FES kötődik a "kationhoz"? Az eredményt a VI. Táblázat mutatja.

VI. Táblázat. FEAK képződése FES-val kezelt patkányok májában.

Állatcsoport	Máj össz karnitin	91-es tömeg	150-es tömeg
	(nmol/g)	intenzitása	intenzitása
	relatív önkényes egység		
FES			
I	185	2,760	579
II	192	1,940	368
FES plusz Bu			
III	525	8,580	1,870
IV	482	7,820	1,428

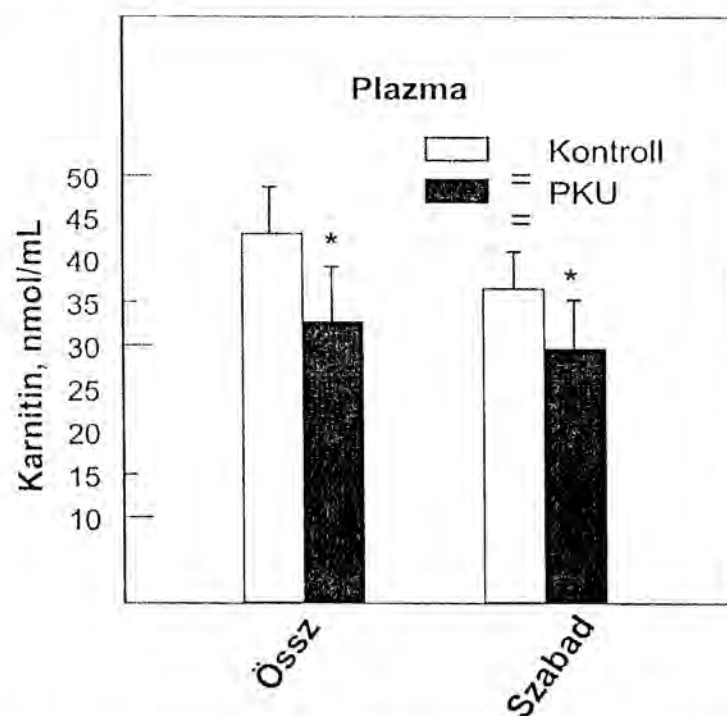
Két patkány (I,II) 1.0 ml fiziológias sóoldatot kapott i.p. (FES csoport), másik kettő (III,IV) 1 mmol Bu-t kapott 1.0 ml sóoldatban (FES plusz Bu csoport) 4 órával leölésük előtt. 1 órával leölésük előtt az összes állat kapott 1.2 mmol per kg FES-t. A semlegesített 130 µl metanol-HCl oldatból (amely 125 mg eredeti máj szövetet reprezentált) 1 µl-t injektáltunk a GC-MS készülékbe. További részleteket illetően lásd a *Módszerek* fejezetet és a 9. ábra leírását. Rövidítések: FEAK, Fenacetilkarnitin; FES, Fenilecetsav; Bu, butirobetain.

A VI. Táblázat adatai egyértelműen bizonyítják, hogy a FES karnitin észtert, azaz FEAK-ot képezett, mivel a karnitin szint emelésével a kritikus tömegszámok is jelentősen emelkedtek.

II.4. Fenilketonuriában szenvedő betegek karnitin státusza.

Az ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK, *Betegek* részében részletesen leírt beteganyag plazmájában megmértük a szabad és össz karnitint, melynek eredményét a 9. Ábra mutatja.

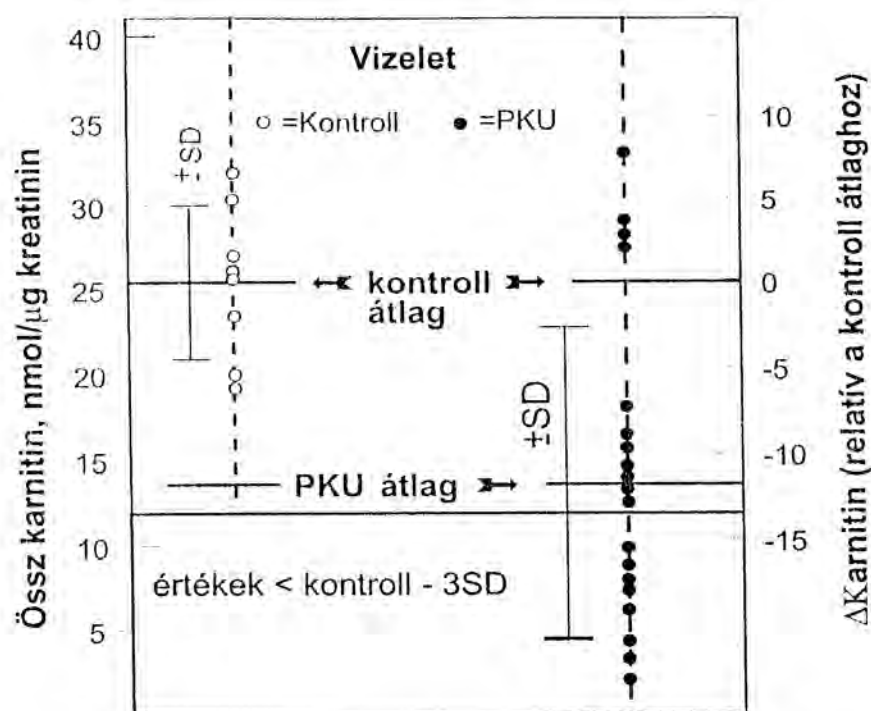
9. Ábra. Az össz és szabad karnitin szintek PKU betegek plazmájában.



Az oszlopok a karnitin szinteket mutatják (átlag \pm SEM) 8 egészséges kontroll (4 férfi, 4 nő) valamint 19 (10 férfi, 9 nő) PKU betegben. * $P > 0.02$.

Mint a 9. Ábra mutatja a betegek plazmájában enyhe, de szignifikáns csökkenést találtunk mind az össz, mind a szabad karnitint illetően. Ezen csökkenés lehetséges mechanizmusát megközelítendő (fokozott karnitin ürítés?) ugyanezen betegek vizeletében is meghatároztuk a karnitin tartalmat (10. Ábra).

10. Ábra. Az össz karnitin szintje PKU betegek vizeletében.



Minden kör egy önálló személy össz karnitin értékét reprezentálja (nyílt körök a kontroll személyekét, a zárt körök a PKU betegeket). Nyolc egészséges kontroll (4 férfi, 4 nő) és 19 PKU beteg (10 férfi, 9 nő) adatát ábrázoltuk. A személyek azonosak voltak a 9. Ábrában szerepeltekkel.

Mint az Ábrán látható (10. Ábra) a vizeletben történő karnitin meghatározásnál eredetileg nagyobbak az egyének közötti különbségek a kontrolloknál is, ezért az egyes betegek adatait egyénenként ábrázoltuk. Figyelemreméltó, hogy a PKU páciensek karnitin értéke lefelé tér el a kontrollok átlagától, és különösen az, hogy a 19 betegből 8-nak a vizelet karnitin szintje messze a kontrolloké alatt (<3 SD) volt.

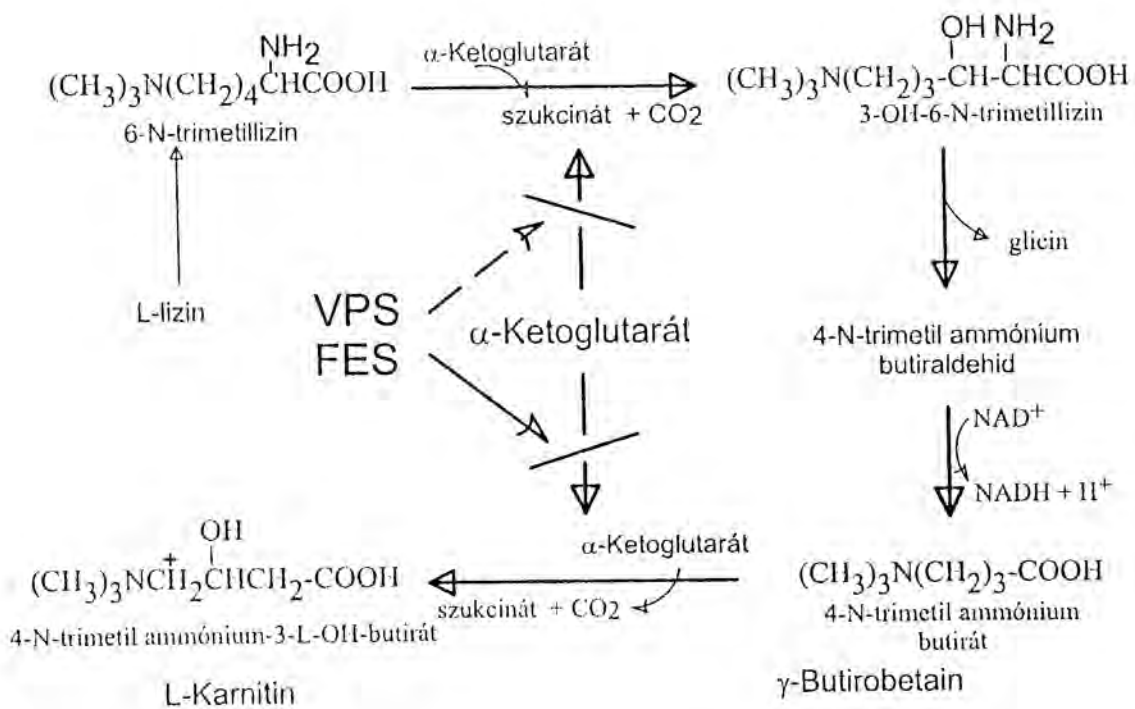
A 9. és a 10. Ábra adatainak összevetéséből megállapíthatjuk, hogy a PKU betegek plazmájában csökkent karnitin szintre nem egy fokozott ürítés a magyarázat.

A kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a Fenilecetsav gátolja a karnitin bioszintézisét a butirobetain-hidroxiláz enzimen keresztül történő fluxus gátlásával, és ezen hatást az enzim egyik koenzimjének, az α -ketoglutarát szintjének a csökkentésével fejtí ki. Kimutattuk továbbá egy eddig le nem írt vegyület, a Fenacetilkarnitin létezését Fenilecetsavval kezelt patkányok májában. Megfigyeltük, hogy a fenilketonuriában szenvedő betegek szérumában a karnitin koncentrációja csökkent.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A disszertációmban leírt kísérletes munkák során megállapítottuk, hogy a Valproát nevű antikonvulzív gyógyszer és a Fenilecetsav, a kóros fenilalanin lebontás során felhalmozódó egyik termék, gátolják a karnitin bioszintézisét. A bioszintézisre kifejtett gátló hatást döntően az α -ketoglutarát szint csökkentésének tulajdoníthatjuk, mivel az α -KG kofaktora a karnitin bioszintézis lépéseinek sorában szerepet játszó két hidroxilezési reakciónak is (11. Ábra).

11. Ábra A Valproát és a Fenilecetsav karnitin bioszintézisére kifejtett gátló hatása és ennek mechanizmusa



Mint az ábrából látható, a bioszintézisben két α -KG függő hidroxilezési reakció, a trimetillizin hidroxiláz és a butirotetain hidroxiláz fordul elő. Kísérleteinkben mi csak az utóbbi, a Bu-hidroxiláz enzimén keresztül történő fluxust mértük, és annak jelentős csökkenését állapítottuk meg mindkét gátló ágens esetében (2,5 Ábra), amit az α -KG szintjének csökkenése kísért. Az α -KG szintben

történt változások (IV. Táblázat, 7. Ábra, pl. 73.5 kontroll értékről 52 nmol/g-ra Valproát esetén) hatékonyak lehetnek az enzimen keresztül történő *in vivo* fluxus csökkentésében, mivel ez a tartomány jóval az enzim telítési szintje alá esik.

Patkány máj Bu-hidroxiláz esetében 0.5 mmol/L K_M értéket írtak le α -KG-ra (42). A mért α -KG értékek a teljes sejtre vonatkoznak, a változás a citoszolban, a Bu-hidroxiláz előfordulási helyén, még kifejezettebb lehet. Joggal feltételezhetjük továbbá, hogy az α -KG szint csökkenés a másik hidroxilező enzimen, a trimetillizin hidroxilázon keresztül történő fluxust is érinti, hozzájárulva ezáltal a Valproát és a Fenilecetsav teljes *in vivo* gátló hatásának kifejtéséhez.

Arra a kérdésre, milyen mechanizmussal csökkentették nevezett ágensek az α -KG szintjét, a magyarázatot az egyidejűleg bekövetkező L-glutamát szint csökkenésben keressük, mivel az α -KG és a Glu egymásnak partner szubsztrátjai a reverzibilis glutamát dehidrogenáz és glutaminsav transzamináz reakciókban. Ez szükségszerűen veti fel a következő kérdést: milyen mechanizmussal csökkent a Glu szintje?

A Valproát esetében a csökkent glutamát szint okaként egy iradalmi adatra hivatkozhatunk, amely szerint a Valproát fokozza a glutamát dekarboxiláz aktivitást (43). Ez azonban feltehetően nem lehet az egyetlen mechanizmus, mert az idézett irodalom (Ref. 43, Löscher, W et al.) agyra vonatkozik, mi pedig Glu szint csökkenést a patkány agyban nem tudtunk kimutatni sem egyszeri dózis, sem egy hetes Valproát kezelés hatására sem (nem ábrázolt adatok). Feltehetően más mechanizmus is szerepet játszik, hipotézisünk szerint valamely más Glu származék, például N-Valproil-Glu képződhet. A májban nagymértékben csökkent Glu szint azonban igen valószínű magyarázatot adhat egy másik régóta ismert, meg nem értett jelenségre, nevezetesen, hogy a Valproát kezelés egyik mellékhatása emberben a hiperammonémia. A Glu szint komoly esése a májban, nagyon valószínűvé teszi, hogy az N-acetil-glutamát mennyisége is csökkent. Ez megmagyarázhatja a hiperammonémiát, mivel a szabad ammónia eltávolításának fő módja a májban a karbamid szintézis, az N-acetil-glutamát pedig a karbamid szintézis első enzimje, a karbamoil foszfát szintetáz I aktivátora. Ezen hipotézisből következőleg, egyik következő feladatunk az N-acetil-Glu szint mérése.

A Fenilecetsav karnitin szintézist gátló hatása jól összeeseng egy nemrégiben megjelent közleménnyel (44), amely szerint az emberi terápiában is alkalmazott benzooesav kezelés (hiperglicinemia esetén) karnitin deficienciát okoz. A Glu és következésképp az α -KG szintet csökkentő hatás mechanizmusát illetően a Valproát esetén hasonlót tételezünk fel.

A FES kapcsán jelentősnek tartjuk a Fenacetil-karnitin létezésének felismerését. A PKU betegek esetén megállapítottuk, hogy enyhén csökkent plazma karnitin koncentrációk mellett a vizelettel való karnitin ürítés (a betegek többségében) drasztikusan csökkent. A két jelenség együtt egy csökkentett sebességű karnitin bioszintézissel magyarázható, mely esetben a vese az ürítés csökkentésével próbálja az elégtelen szintézist kompenzálni a plazma és szöveti karnitin szintek fenntartása végett. A FES és PKU kapcsán végzett vizsgálataink két nyilvánvaló kérdést vetnek fel, amely számunkra munkahipotézisként szolgál.

- elméleti szempontból: előfordul-e a Fenacetil-karnitin a PKU betegekben is?

- gyakorlati szempontból: a PKU betegek karnitin szuplementálása, amelyet a Valproát esetén munkacsoportunk már alkalmazott (20).

IRODALOM

1. Gulevitsch, V.S., Krimberg, R.: Zur Kenntnis der Extraktstoffe der Muskeln II. Mitteilung-Über das Carnitin. *Hoppe-Seylers, Z. Physiol. Chem.* **45**, 326, (1905).
2. Tomita, M. and Y. Sendju: Über die Oxyaminverbindungen, welche die Biuretreaktion zeigen. III. Spaltung der γ -amino- β -oxybuttersäure in die optisch-aktiven Komponenten. *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **169**, 263, (1927).
3. Carter, H.E., Bhattacharyya, P.K., Weidman, K.R. and Fraenkel G. Chemical studies on vitamín B₇ isolation and characterization as carnitine. *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 405-416, (1952).
4. Fritz, I. B.: The effect of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates. *Acta Physiol. Scand.* **34**, 367, (1955).
5. Bremer, J. Carnitine- Metabolism and Functions *Phys.Rev.* **63**, 1420-1480, (1983).
6. McGarry, D.J., Woeltje, K.F., Kuwajima, M., Foster, D.W. Regulation of ketogenesis and the renaissance of Carnitine Palmitoyltransferase. *Diabetes*, **5**, 271-284, (1989).
7. Pande, S. V. and Parvin, R. *J. Biol. Chem.* **251**, 6683-6691, 1976.
8. Alkonyi, I., Kerner, J. and Sandor, A. The possible role of carnitine and carnitine acetyl-transferase in the contracting frog muscle., *FEBS Lett.* **52**, 265-268, (1975)
9. Engel, A.G. and Angelini, C. Carnitine deficiency of human muscle with associated lipid storage myopathy: a new syndrome. *Science* **179**, 899-902, (1973).
10. Engel, A.G., Rebouche, C.J.: Carnitine metabolism and inborn errors. *J. Inher. Metab. Dis.* **7 Suppl. 1**, **38** (1984).
11. Roe C.R., Millington D.S., Maltby D.A., Bohan T.P. and Hoppel C.L.: L-carnitine enhances excretion of propionyl coenzyme A as propionylcarnitine in propionic acidemia. *J. Clin. Invest.* **73**, 1785-1788, (1984).
12. Melegh, B., Kerner, J., Bieber, L.L.: Pivampicillin promoted excretion of pivaloylcarnitine in humans. *Biochem. Pharm.* **36**, 3405-3409, (1987)
13. Macdonald, R.L.: Anticonvulsant drug actions on neurons in cell culture. *J. Neural Transm.* **72**, 173-183 (1988)

14. Löscher, W. Valproic acid. In, Antiepileptic Drugs. (Frey, H.-H., and Janz, D., eds.) Handbook of experimental Pharmacology, Vol. 74. Springer-Verlag, Berlin, 1985. pp.507-537.
15. Van Der Laan J.W., De Boer T, Bruinvels J.: Di-n-propylacetate and GABA degradation. Preferential inhibition of succinic semialdehyde dehydrogenase and indirect inhibition of GABA-transaminase. *J. Neurochem.* **32**, 1769-1780, (1979).
16. Löscher W., Nau H.: Valproic acid: metabolite concentrations in plasma and brain, anticonvulsant activity, and effects on GABA metabolism during subacute treatment in mice. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **257**, 20-31, (1982).
17. Löscher W., Böhme G., Schafer H., Kochen W.: Effect of metabolites of valproic acid on the metabolism of GABA in brain and brain nerve endings. *Neuropharmacology* **20**, 1187-1192, (1981).
18. Baillie T.A. and Rettenmeier A.W.: Valproate biotransformation. In: Antiepileptic Drugs (Eds. Levy R.H., Mattson R., Meldrum B., Penry J.K., Dreifuss F.E.), pp.601-619. Raven Press, New York (1989).
19. Dreifuss F.E.: Hepatic toxicity of valproate. In: Idiosyncratic Reactions to Valproate (eds. Levy R.H. and Penry J.K.), pp.9-12. Raven Press, New York (1991).
20. Melegh B., Kerner J., Acsadi G., Lakatos J. and Sandor A.: L-carnitine replacement therapy in chronic valproate treatment. *Neuropediatrics* **21**, 40-43, (1990).
21. Schmidt-Sommerfeld E., Penn D., Rinaldo P., Kossak B.D., Li B.U.K., Huang Z.H. and Gage D.A.: Urinary medium-chain acylcarnitines in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr. Res.* **31**, 545-551, (1992).
22. Riva R., Albani F., Gobbi G., Santucci M. and Baruzzi A.: Carnitine disposition before and during valproate therapy in patients with epilepsy. *Epilepsia* **34**, 184-187, (1993).
23. Murakami K., Sugimoto T., Nishida N., Woo M., Araki A. and Kobayashi Y.J.: Alterations of urinary acetylcarnitine in valproate-treated rats: The effect of L-carnitine supplementation. *Child. Neurol.* **7**, 404-407, (1992).

24. Bohan T.P., Millington D.S., Roe C.R., Yergey A.L. and Liberto D.: A novel metabolite of valproic acid. *Ann. Neurol.* **16**, 394-398, (1984).
25. Kossak B.D., Schmidt-sommerfeld E., Scholle D.A., Rinaldo P., Penn D. and Tonsgard J.H., *Neurology*, **43**, 2362 (1993).
26. Chalmers R.A., Roe C.R., Stacy T.E. and Hoppel C.L.: Urinary excretion of L-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: Evidence for secondary insufficiency of L-carnitine. *Pediatr. Res.* **18**, 1325-1328, (1984).
27. Nishida N., Sugimoto T., Araki A., Woo M., Sakane Y. and Kobayashi Y.: Carnitine metabolism in valproate-treated rats: The effect of L-carnitine supplementation. *Pediatr. Res.* **22**, 500, (1987).
28. Thein I., DiMauro S., Xie Z.W. and De Vivo D.C.: Valproic acid impairs carnitine uptake in cultured human fibroblasts. An *in vitro* model for the pathogenesis of valproic acid-associated carnitine deficiency. *Pediatr. Res.* **34**, 281-287, (1993).
29. Stadtman, E.T., Preparation and assay of acetyl-coenzyme A and other thioesters. In: *Methods Enzymology* (Eds. Colowick SP and Kaplan NO), Vol. **3**, pp. 931-941. Academic Press Inc, New-York, (1957).
30. Ingalls S.T, Hoppel CL and Turkaly JS, Synthesis of radiatively methyl-labelled (1)-carnitine *J. Labell. Comp. Radiopharm.* **8**:535-541, (1981).
31. Scriver C.R: Whatever happened to PKU? *Clin. Biochem.* **28**: 137-144, (1995).
32. Cederblad G. and Linstadt S.: A method for the determination of carnitine in the picomolar range. *Clin. Chim. Acta* **37**, 235-243 (1972).
33. Brass EP and Hoppel CL, Carnitine metabolism in the fasting rat. *J. Biol. Chem.* **253**:2688-2693, (1978).
34. Michal G and Bergmayer HU 2-Oxoglutarate. In: Bergmayer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press Inc., New York, Volume **4**, pp 1577-1580, (1974).
35. Michal G and Bergmayer HU l-glutamate. In: Bergmayer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press Inc., New York, Volume **4**, pp 1705-1715, (1974).

36. Sandor A, Minkler PE, Ingalls ST, Hoppel CL An enzymatic method for the determination of butyrobetaine via conversion to carnitine after isolation by high performance liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta* **176**:17-28, (1988).
37. Michal G and Bergmayer HU Coenzyme A. In: Bergmayer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press Inc., New York, Volume **4**, pp 1967-1987, (1974).
38. Sandor A, Cseko J, Alkonyi I: Use of anion exchange resin in F⁻ form in sample processing for determination of carnitine. *J. Chrom.* **479**:250-257, (1989).
39. Kumps A, Duez P, Mardens Y: Gas chromatographic profiling and determination of urinary acylcarnitines. *J. Chrom.* **658**: 241-248, (1994).
40. Sandor A. and Hoppel C.L.: Butyrobetain availability in liver is a regulatory factor for carnitine biosynthesis in rat. *Eur. J. Biochem.* **185**, 671-675 (1989)
41. Sandor A. Butyrobetaine is equal to L-carnitine in elevating L-carnitine levels in rats. *Biochem. Biophys. Acta.* **1083**, 135-138, (1991).
42. Lindstedt G. and Lindstedt S.: Cofactor requirements of γ -butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **245**, 4187-4192 (1970).
43. Löscher W.: Effects of the antiepileptic drug valproate on the metabolism and function of inhibitory and excitatory amino acids in the brain. *Neurochem. Res.* **18**, 485-502 (1993).
44. Vanhove J.L.K., Kishnani P., Muenzer J., Wenstrup R.J., Summar M.L., Brummond M.R., Lachiewich A.M., Millington D.S. and Kahler S.G.: Benzoate therapy and carnitine deficiency in nonketotic hyperglycemia. *Am. J. Med. Gen.* **59**, 444-453 (1995)

JELÖLT PUBLIKÁCIÓI

Absztraktok:

- V. Farkas**, I. Bock, J. Csekő és A. Sándor: A karnitin bioszintézisének gyógyszerek okozta gátlása patkányban. XXIV. Membrán-Transzport Konferencia Sümeg, 1994 május 24-27.
- B. Debreceni, **V. Farkas**, G. Fischer, J. Cseko and A. Sandor: The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on the carnitine biosynthesis in rats. 2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society 21-23 August 1995, Szeged, Hungary.
- V. Farkas**, G. Kelenyi and A. Sandor: Glycogen deposition in in brown adipose tissue following cease of cold stress. 3rd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, 6-9 July 1997, Pécs Hungary.
- A. Sandor, G. Kelenyi, **V. Farkas**. Dramatic increase of glycogen in brown adipose tissue of rats during post-cold glycogen repletion. 25th Silver Jubilee FEBS Meeting, July 5-10, 1998, Copenhagen, Danmark.

Előadás:

- Sandor, A., Kelenyi, G. and **Farkas, V.** Post-cold glycogen replenishment in rat tissues, especially in the brown adipose tissue. 3rd International Conference of Hungarian Biochemical Society 6-9 July, Pécs, Hungary.

Közlemények:

- Viktoria Farkas, Ildiko Bock, Joseph Cseko and Attila Sandor Inhibition of Carnitine Biosynthesis by Valproic Acid in Rats-The biochemical mechanism of inhibition. Farkas, V., Bock, I., Cseko, J. and Sandor, A. *Biochem. Pharm.* **52**, 1429-1433, (1996).
- Gabor M. Fischer, **Viktoria Farkas**, Balazs Nemethi, Balazs Debreceni, Aranka Laszlo, Zsuzsa Schaffer and Attila Sandor: Carnitine metabolism in phenylacetic acid-treated rats and in patients with phenylketonuria. *Metabolism* (in press).
- Viktoria Farkas**, Gabor Kelenyi and Attila Sandor: A dramatic accumulation of glycogen in the brown adipose tissue of rats following recovery from cold exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* (in press).