

Egyetemi Doktori (PhD) értekezés

**A KARNITIN ANYAGCSERÉJE FENILECETSAVVAL ÉS BENZOESAV
ANALÓG GYÓGYSZEREKKEL KEZELT PATKÁNYOKBAN VALAMINT
FENILKETONURIÁBAN SZENVEDŐ BETEGEKBN**

Dr. Fischer Gábor

**Pécsi Orvostudományi Egyetem
Biokémia Intézet
2000**

**Programvezető:
dr. Sümegi Balázs**

**Témavezető:
dr. Sándor Attila**

TARTALOMJEGYZÉK

| | |
|--|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE | 3 |
| TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK | 4 |
| CÉLKITŰZÉSEK | 9 |
| ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK | 10 |
| EREDMÉNYEK | 15 |
| I. A fenilalanin lebontás metabolitjainak hatása a karnitin bioszintézisre | 15 |
| I. 1. <i>A gátlást mutató metabolit kiválasztása, a gátlás bizonyítása</i> | 14 |
| I. 2. <i>A Fenilecetsav okozta karnitin szintézis gátlás lehetséges mechanizmusa</i> | 20 |
| I. 3. <i>A Fenacetil-karnitin (FEAK) létének bizonyítása patkány májában</i> | 21 |
| I. 4. <i>Fenilketonuriában szenvedő betegek karnitin státusza</i> | 26 |
| I. 5. <i>FEAK a fenilketonuriában szenvedő betegek vizeletében</i> | 28 |
| II. Benzoesav analóg gyógyszerek hatása a karnitin bioszintézisre | 30 |
| II. 1. <i>A gátlást mutató gyógyszer kiválasztása</i> | 30 |
| II. 2. <i>A PAMBA okozta karnitin szintézis gátlás mechanizmusa</i> | 33 |
| AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE | 34 |
| IRODALOM | 37 |
| JELÖLT PUBLIKÁCIÓI | 40 |

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

| | |
|--------------|--|
| Bu | Butirobetain |
| CoA | koenzim A |
| CAT | karnitin acetyl-transzferáz |
| COT | karnitin oktanoil-transzferáz |
| CPT | karnitin palmitoil-transzferáz |
| DOPA | dihidroxifenilalanin, |
| FEAK | Fenacetyl-karnitin |
| FES | Fenilecetsav |
| GS-MS | Gáz kromatográf-tömegspektrográf |
| HLK | Hosszú Láncú Acil-karnitin |
| HVA i.p. | Homovanillinsav intraperitoneális |
| α -KG | α -Ketoglutarát, α -Ketoglutarát |
| PAMBA | Paraamino-metilbenzoesav |
| PKU | Fenilketonuria |
| RLK | Rövid Láncú Acil-karnitin |

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

Az L-karnitint (L-3-OH-4-N-trimetil-aminobutírat), 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 B₇ vitamin hiányában (T a *Tenebrio* utal) a zsír felszaporodik és a lárvá ennek következtében "zsír-halált" hal, mert nem tudja saját zsírraktárait éhezéskor tápanyagforrásként felhasználni (3). A kutatásoknak további ösztönzést adott Fritz felismerése, hogy a karnitin patkánymáj homogenizátumban is nagymértékben fokozza a zsírsavak oxidációját (4).

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

- karnitin acetil-transzferáz (CAT) az acetát és a rövidláncú zsírsavak CoA észterei számára. Mitokondriumban és citoszolban lokalizált.
- karnitin oktanoil-transzferáz (COT) a közepes láncosságú zsírsavak számára. Lokalizációja mitokondrium, peroxizóma és endoplazmatikus retikulum.
- karnitin palmitoil-transzferáz (CPT) a hosszúláncú zsírsavak számára. Kettősen

lokalizált a mitokondriumban, a CPT I a külső membrán belső felszínén, a CPT II pedig a belső membrán belső felén helyezkedik el.

Mai ismereteink szerint a karnitin elsődleges biológiai funkciója a hosszú szénláncú zsírsavak elégetéséhez kötött: az aktivált zsírsavakat a citoplazmából bejuttatja a mitokondrium mátrixába, mivel a hosszúlancú zsírsavak és CoA észterei számára a mitokondrium belső membránja nem permeabilis. A folyamat menete a következő: a CoA észterről a zsírsavak a CPT I enzim segítségével karnitinre kerülnek át. Az acil-karnitin a mitokondrium belső membránjában lévő karnitin transzlokáz segítségével bekerül a mátrixba egy cseretranszport folyamatban, miközben egy szabad karnitin molekula lép ki (7). A mátrixba bejutott acil-karnitinről az acilcsoportot a CPT II CoA-ra transzferálja, a CoA észter pedig a β - oxidáció folyamatában feldarabolódik acetil-CoA egységekre és eléghet.

A karnitinnek 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 enzimekreakciók (piruvát dehidrogenáz, citrát kör) számára. (8).

2./ Szintén a CAT és a COT segítségével kórosan jelenlévő és felszaporodott (esetleg arteficiális) felszaporodott rövid és középlancú savakat vesz át CoA -ról, és a 2. pontban említett funkción kívül lehetővé teszi ezen savak szervezetből való eliminálását.

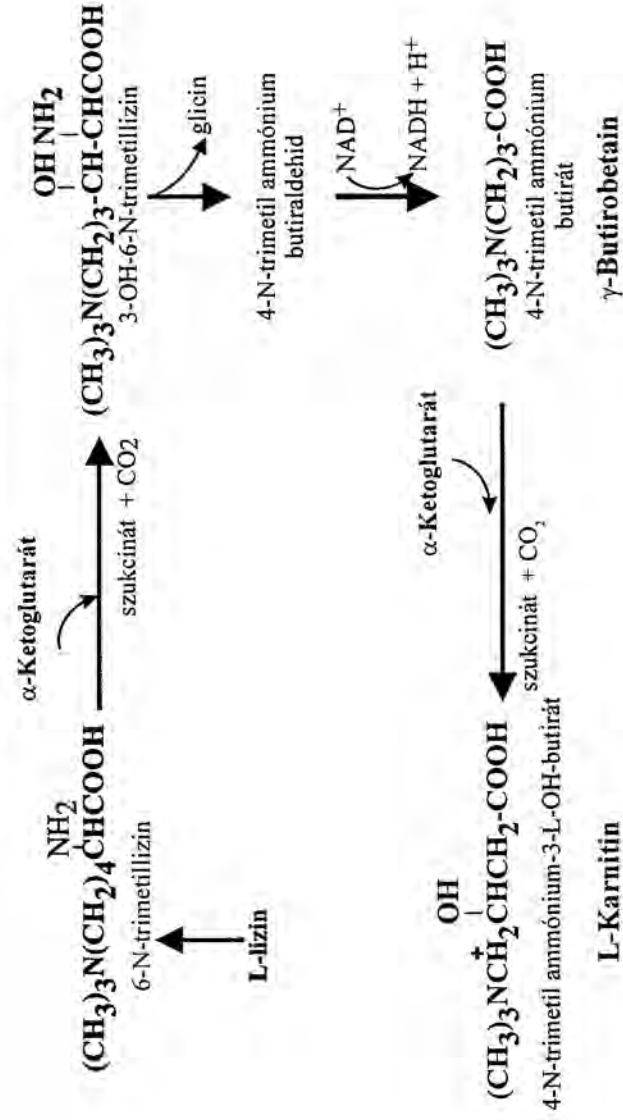
Mint a fentiekből érzékelhető, a karnitinnel kapcsolatos kutatások a legelméletibb biokémiától (pl. enzimkinetika) a klinikai gyakorlatig terjednek. A kutatásokat az első karnitin deficiencia okozta kórkép felismerése terelte gyakorlati irányba (9), amely mai ismereteink és osztályzásunk szerint elsődleges karnitin deficiencia volt. Ismeretesebb továbbá a másodlagos karnitin deficienciák, melyek anyagcserebetegségekhez társulnak (pl. aminoaciduriák) vagy lehetnek egyes gyógyszerek által okozott arteficiálisak (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 trimetililizin. 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^{2+} 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, hörcsög, 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 mechanizmusa, 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).

Munkacsoportunk előzőleg a Valproát nevű antiepileptikummal foglalkozott, amelyről ismert volt, hogy mellékhatásként karnitin deficienciát okoz (összefoglaló irodalomként lásd 13.). Valproáttal kezelt gyermekek esetén karnitin kiegészítést is alkalmaztunk (14). Újabb munkánkban kimutattuk, hogy a Valproát nem karnitin észter képzés révén okozza a karnitin deficienciát, hanem gátolja a karnitin bioszintézisét (15).

Fenti során figyeltük meg, hogy a benzoésav is gátolja patkányban a karnitin bioszintézisét. Ezen megfigyelésünk nagyon jól egybecsengett azon közleménnyel, amely karnitin hiány kialakulását figyelte meg benzoésavval kezelt páciensek esetén (16). Ugyanezen közlemény benzoilkarnitin jelenlétét is kimutatta a betegek vizeletében.

Jelen munkám első részében fenilalanin (Phe) lebontási termékeinek esetleges hatását vizsgáltuk, miután ezek mindegyike tartalmaz benzol gyűrűt. 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 (összefoglaló irodalomként lásd 17.). A szóbjárható 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.

További lépés a benzoeshav analóg gyógyaszerek hatásának tesztelése.

Nevezetesen a gyulladásgátló acetil-szalicilsavat (Aspirin), az antituberkulotikus hatású paraamino-szalicilsavat (PAS), a parkinsonizmus kezelésére használt dihidroxi-fenilalanin (DOPA) fő metabolitját a homovanillinsavat (HVA), továbbá a hemosztatikus hatású paraamino-metilbenzoeshav-at (PAMBA) szándékoztunk kipróbálni. Nevezett vegyületek szerkezetét a 9. Ábra mutatja.

CÉLKITŰZÉSEK

A kísérletek tervezésekor a következő kérdésekre vártunk választ:

- gátolja-e a FES, a fenilpiroszölősav és a homogentizinsav a karnitin bioszintézisét patkányban? Ha igen, közülük melyik a leghatásosabb?
- 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. Miután azt találtuk, hogy a nevezett szerek közül a FES a leghatásosabb, a következő kérdés:
- mi a FES karnitin szintézist gátló hatásának mechanizmusa:
1. Ezen belül felmerül a Bu- hidroxiláz kofaktorainak, az aszkorbinsav és az α -KG szinteknek a befolyásolása.
 2. Szükséges a karnitin , karnitin észterek mérése májban, plazmában a karnitin státusz megítélése végett.
- PKU-ban szenvedő betegek karnitin státuszának vizsgálata
 - egy feltételezett új metabolit, a fenacetil karnitin (FEAK) létének bizonyítása patkány májában, esetleg PKU betegek vizeletben.
 - A benzoeshav analóg gyógyszerek közül kibróbáljuk a szalicilsavat, a homovanillinsavat, a PAS-t és a PAMBA-t, van-e karnitin szintézist gátló hatásuk a fenti módszerekkel vizsgálva.
 - Miután azt találtuk, hogy nevezett gyógyszerek közül a PAMBA mutat karnitin szintézist gátló hatást, kérdés, mi a hatásmechanizmusa, a fentebb említett munkahipotézis szerint vizsgálva. Vizsgáljuk továbbá, megfigyelhető-e struktúra-hatás összefüggés a fenti gyógyszerek esetén.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

Az Acetil-CoA-t magunk preparáltuk ecetsavanhidridből és koenzim A (CoA)-ból leírt eljárás szerint (18). A [^3H]Butirotetaint körülbelül 10^6 cpm/nmol specifikus aktivitással szintetizáltuk 4-N-dimetilamino-vajsavból (Aldrich Chemical) és [^3H] $_3\text{CJ}$ -ből (Amersham, UK) leírt eljárás szerint (19). Az [$1\text{-}^{14}\text{C}$]Acetil-CoA-t az Amersham (UK) cégtől vásároltuk. Az összes többi speciális finomvegyszer a Sigma-Aldrich (Budapest) cégtől származik.

Betegek

A PKU betegek plazmáit és 24-órás gyűjtött vizeletét a SZOTE Gyermekklinika (dr. László Aranka) és a budapesti PKU centrum (dr. Schüller Ágnes) bocsátotta rendelkezésünkre. A kiválasztott 19 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 $\text{mg}^0\%$ közé esett.

Állatok és kezeléseik

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 PAMBA esetén egyes kísérletekben a gyógyszert az állatok 24 órán át ivóvízükben kapták. A kontrollokat NaCl oldattal injektáltuk. Azokban a kísérletekben, ahol a beadott anyagnak a radioaktív vagy a nem-radioaktív butirotetainnak a karnitinné való átalakulásra gyakorolt hatását vizsgáltuk, az állatok a butirotetaint 30 perccel később, azaz 30 perccel leölésük előtt, ugyanilyen módon kapták. A radioaktív kísérletekben általában 1.5×10^7 cpm [^3H]Butirotetaint 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°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 radioizotopos enzimátikus analízissel határoztuk meg (20), amelynek elve röviden a következő. $[1-^{14}\text{C}]\text{Acetil-CoA}$ -ról CAT enzim segítségével az $[1-^{14}\text{C}]\text{Ecetsavat}$ karnitinre visszük át és így módon a mintában jelenlevő karnitint quantitative radioaktív acetilkarnitinné alakítjuk. Az elegyet kis Pasteur pipettában lévő anioncserélő gyantán (pl. Dowex 1×8 , Cl^- formában) átfolyatjuk, a feleslegben maradt erősen savas $[1-^{14}\text{C}]\text{Acetil-CoA}$ -t a gyanta megköti, a kation természetű (quaterner N csoport!) radioaktív acetilkarnitint pedig átengedi. Az átfolyó eluátum radioaktivitását mérjük. Látható, hogy ezen módszer, csakugy mint a többi enzimátikus analízis, a szabad karnitint méri. A rövid és hosszú láncú karnitinszterek 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 lánc hosszúságig oldodnak 0.5 N perklórsavban, a hosszúlancú karnitinszterek 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 savoldható össz karnitin értéket kapjuk. A kettő különbsége a rövidlancú acil-karnitin. 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 (21). Munkám során össz karnitin értéken a három frakció összegét értem.

2./1-Glutamát (Glu) és α -KG meghatározása. Nevezett szubsztrátokat

semlegesített perklorosavas máj extraktumból glutamát dehidrogenáz enzim segítségével, standard enzimátikus 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 (22) vagy a Glu-t (23).

3./Az aszkorbinsav meghatározása a máj metafoszfororsavas extraktumában történt UV spektrofotometriás módszerrel, az aszkorbinsav oxidációját jelző redoxfesték (diklórfenol-indofenol) segítségével (24).

Folyadékkromatográfás (HPLC) elválasztás

A Bu és a karnitin elválasztását a Bu \rightarrow karnitin *in vivo* átalakulás sebességének megítélése céljából végeztük. Az állatok a [³H]Bu-t *in vivo* kapták és 30 perc múlva történt leölésük után a májukból származó mintában meghatároztuk a radioaktív butirobectain és a radioaktív karnitin arányát (25).

A minta feldolgozása és az elválasztás alapvetően a korábban leírtak szerint történt (26). 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 eldobtuk. Az oszlop a pozitív töltésű trimetilaminokat, így a számunkra fontos anyagokat megkötötte. Ezután az oszlopot áthelyeztük egy másik ugyanilyen méretű oszlop fölé, mely 0.5 cm \times 4 cm Dowex 1 \times 8 OH⁻ fázisban lévő anioncserélőt tartalmazott. A felső oszlopra 3.0 ml 2.4 N NH₄OH-ot tettünk és ettől kezdve az eluátumot gyűjtjük az alsó oszlopból. (Az NH₄ fázisba átalakuló felső kationcserélő gyanta a számunkra érdekes anyagokat nem köti meg). Végül izolálандó 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, trimetilizin), 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 detektorból állt. Az oszlop Supelcosil™ 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.

A HPLC módszerét alkalmaztuk továbbá a karnitin szeparációjára a karnitin észterektől FES-val kezelt patkányok májában a FEAK elválasztása, azonosítása, azaz létének bizonyítása céljából. Ez esetben a FES adása előtt az állatok karnitin "pool"-ját radioaktív tríciummal jelöltük (lásd alább), hogy az elválasztás detektálható legyen a radioaktivitás követésével.

A HPLC apparátus a fenti volt, az elválasztás gradiens elúcióval történt. Az *A* oldat 0.01 M Na-heptanesulfonát volt, amelynek pH értékét pH 2.5-re állítottuk koncentrált foszforsavval. A *B* oldat 20 % *A* oldatból és 80 % metanolból állt. Az ábrán mutatott metanol grádiens (5. Ábra) a fenti *A* és *B* oldatból alacsony nyomású gradiens "controller" segítségével hoztuk létre. Úgy mint az előzőekben, az elúciós sebesség 1.0 ml/min volt, az elúciót fotometrián követtük 210 nm-en és 1.0 ml frakciókat gyűjtöttünk scintillációs "vial"-okba.

Az állatok 5×10^7 cpm jelölt butirobetaint, majd 5 órával később 1.2 mmol/kg FES-t kaptak (ekkorra az összes radioaktív butirobetain átalakult L-karnitin-né és az egész szervezet karnitin "pool"-ja jelöltté vált). Egy órával a FES adását követően az állatokat leöltük. A májból származó semlegesített perklórsavas extraktumot (2.0 ml, megfelelt 250 mg eredeti szövetnek) tisztítás céljából Dowex 50W NH^+ /Dowex 1 F-kombinált ioncserélő gyantára tettük fel és az előzőleg közölt módszer szerint kezeltük (26). A végső eluátumot vákuum centrifugálással (Speed-Vac apparátus) pároltuk szárazra és 1.0 ml -20° C abszolút metanolban felvettük, centrifugáltuk, a szupernatánst ismét bepároltuk és az üledéket 200 µl *A* eluens oldatban vettük fel. Ebben a mintában

ellenőriztük az össz radioaktivitást és 100 μ l-t (125 mg szövet) injektáltunk a HPLC készülékbe. A frakciók radioaktivitásának retenciós idejét hasonlítottuk a hiteles standard preparátumok (L-karnitin, acetyl-karnitin, FEAK) retenciós idejéhez. Utóbbi jelöletlen nem-radioaktív standardok retenciós idejét 210 nm-en történő UV detektálással állapítottuk meg.

Gáz kromatográf tömegspektrográf (GS-MS) analízis

A patkány májának semlegesített perklórsavas extraktumát (250 mg szövet 2.0 ml-ben) vagy 5.0 ml emberi vizeletet erős kationcserélő gyantán tisztítottunk és a FEAK-ot némi módosítással a leírtak szerint detektáltuk (27). 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 acil-karnitint megkötötte. Az oszlopot mostuk 10.0 ml 8:1 aceton:víz eleggyel a szabad FES eltávolítása végett. Ezután az oszlopról a karnitineket 9.0 ml 50% etanolban lévő 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 FEAK is elhidrolizált, és a szabad FES az oszlop eluátumában megjelent. Lényegében tehát a kation-kötött FES-t detektáltuk, amit joggal tekinthetünk karnitin észternek, mint azt független módszerrel és adatokkal (HPLC elválasztás, II. Táblázat) is bizonyítottuk. (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). A karnitinhez kötött acil-csoportokat, így a FES-t, metil észter formájában detektáltuk a GS-MS készülékkel. A derivatizáció májminta esetén 100 μ l, vizeletminta esetén 200 μ l metanol-HCl ben, ledugaszolt üvegcsőben történt 1 órán keresztül $60^\circ C$ -on való hevítéssel, amit 1 N KOH-dal való semlegesítés és centrifugálás követ. Rendszerint 1 vagy 2 μ l tiszta felülúszót injektáltunk a készülék "splitless" üzemmódban levő injektorába.

A GC-MS készülék Shimadzu QP2000 elektron ionizáló készülék volt quadropol detektorral. A 25 m hosszú Hewlett-Packard 19091B-005 0.2mm-es kapilláris oszlop 0.11

µm vastag Ph-Me Silicon-nal volt bevonva. Az injektor hőmérséklet 280°C volt, a kemence hőmérséklet programja a következő volt: 72°C 2 percig, $72\text{--}280^{\circ}\text{C}$ közötti 15°C /perc sebességgel, végül a 280°C -ot még tartotta 3 percig. A hordozó He_2 gáz áramlási sebessége 1.0 ml/perc volt.

EREDMÉNYEK

I. A fenilalanin lebontás metabolitjainak hatása a karnitin bioszintézisre

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

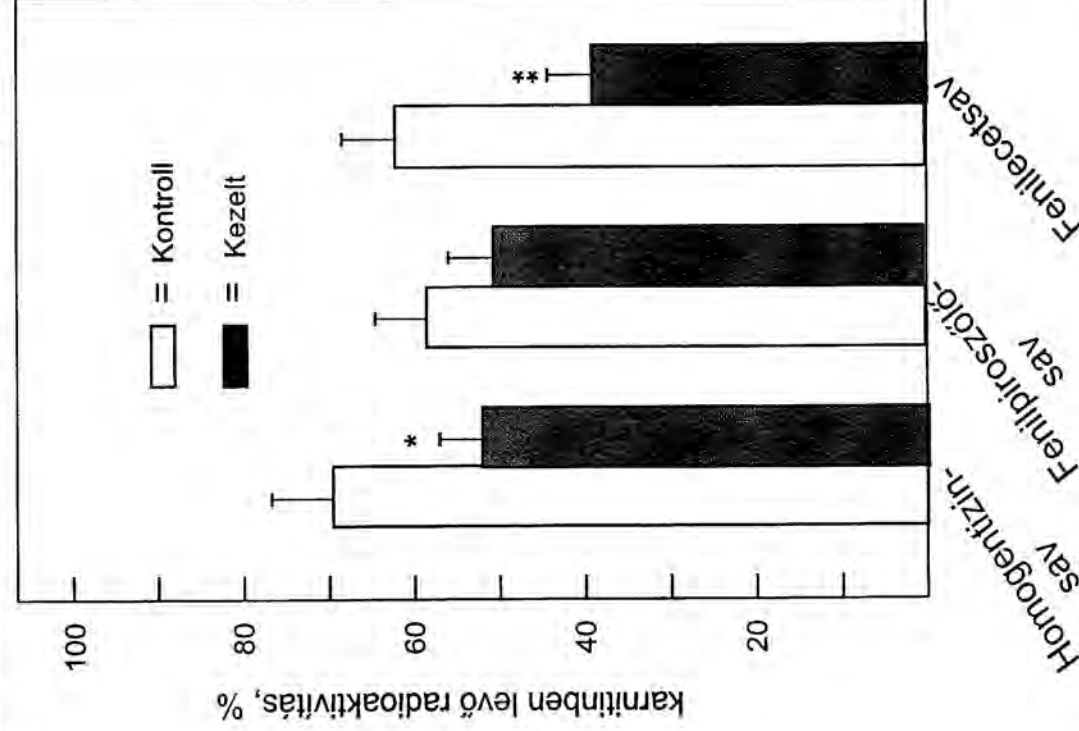
A karnitin bioszintézis utolsó lépését katalizáló butirobetain hidroxiláz enzim patkányban kizárólag a májban fordul elő. Ezért az enzimen keresztül történő fluxus sebességének mérése megbízható adatot szolgáltat a szervezet karnitin ellátásáról. A kontroll állatokban 30 perccel a $[\text{}^3\text{H}]$ 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 (28). (Az injektált Bu-preparátum nagy specifikus radioaktivitásának köszönhetően ez nyomnyi mennyiségnek tekinthető).

Valproáttal végzett kísérleteink során kiderült, hogy a benzoosav szintén gátolja a butirobetain-karnitin átalakulást. Ez adta az ötletet, hogy megvizsgáljuk néhány, biológiai fontossággal bíró benzoosav analóg aromás vegyület esetleges hatását a karnitin bioszintézisre. A természetes metabolitok között keresve figyelmünk az aromás aminosavak anyagcseréjére irányult. A Phe lebontás vizsgálatának jelentőségét, annak humán patológiai vonatkozásait a bevezetésben már hangsúlyoztuk. A következő kísérletben a fenilalanin lebontás három intermedierjét, a fenilpiruvátot, FES-t és homogentizinsavat teszteltük (2. ábra).

A három metabolit közül leghatásosabbnak a fenilecetsav bizonyult, mely 1.2 mmol/kg egyszeri i.p. dózisban alkalmazva, 60 perc múlva a Bu karnitinné történő átalakulását 61.3%-ról 39.3%-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 továbbiakban részletesen a FES hatását tanulmányoztuk.

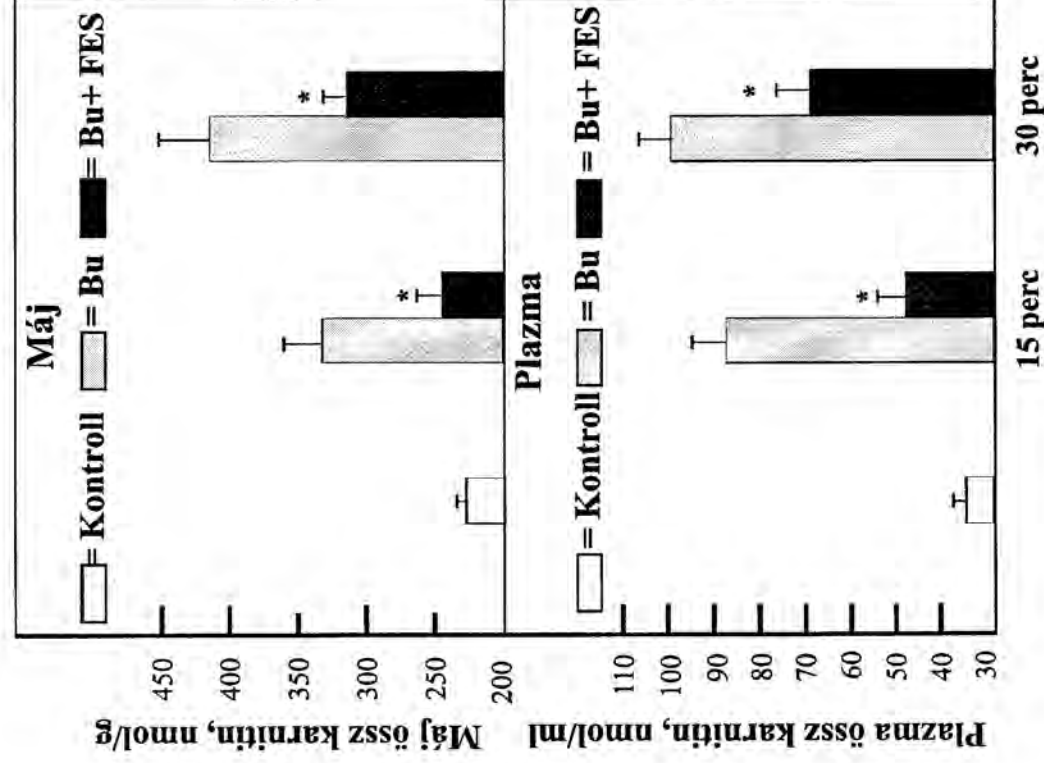
2. Ábra. A fenilalanin lebontás egyes metabolitjainak hatása nyomjelző mennyiségű radioaktív butirobetain karnitinné való átalakulására patkány májában.



Az állatok 1.2 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 adását követően (60 perccel nevezett vegyületek adása után) az állatokat leöltük és 0.5 g máját analizáltunk radioaktivitás megoszlására a butirobetain és karnitin között. Az oszlopok a kinyert össz radioaktivitás karnitinben talált százalékát jelzik (átlag \pm SEM) 8 állat esetében. * $P < 0.02$; ** $P < 0.01$.

A FES esetében a Bu karnitinné való átalakulásának gátlását "kézzelfoghatóan" azáltal bizonyítottuk, hogy demonstráltuk, mennyiségileg jelentős jelöletlen Bu karnitin szintet emelő hatását is gátolja. Ezért radioaktív nyomjelzéssel nyert eredmények és következtetések megerősítése végett a kísérletet úgy ismételtük meg, hogy jelöletlen, molekulárisan terhelő mennyiségű

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



A 3.Ábrához. A Fenilecetsav-val (FES) kezelt állatok (Bu+FES csoport) 1.2 mmol/kg FES-t kaptak. 30 perc múlva a Bu és a Bu+FES csoport 200 μ mol jelöletlen butirobetailt (Bu) kapott. 30 perccel a Bu adását követően (60 perccel a FES adását követően) az állatokat leöltük, májukban és plazmájukban az összes karnitint meghatároztuk. Az oszlopok a karnitin szinteket jelzik (átlag \pm SEM) 4 vagy 5 állat esetében. * $P < 0.01$ ha az értékeket a Bu csoporthoz hasonlítjuk. Rövidítések: FES, fenilecetsav; Bu: butirobetail.

Bu-t adtunk az állatoknak, amely ismert módon gyorsan karnitinné alakul, jelentősen növelve ezáltal a karnitin szintet az állatok szöveteiben (29). 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) jelöletlen Bu-t injektáltunk és az állatok egy csoportját 15 perc, egy másik csoportját 30 perc múlva öltük le. Látható, hogy a FES a Bu hatására bekövetkezett karnitin szint emelkedést igen jelentős mértékben gátolta (3. Ábra).

A butirobetailt egyedül a total karnitin szintet 229 ± 10.5 nmol/g kontroll szintről 336 ± 25.2 majd 416 ± 31.1 nmol/g-ra emelte a májban a 15-ik illetve a 30-ik percben. Mikor az állatok 30 perccel a butirobetailt adása előtt FES-t kaptak, a butyrobetailt csak 246 ± 15.1 majd 316 ± 27.3 nmol/g-ra tudta emelni a karnitin szinteket a 15-ik illetve a 30-ik percben. A számított szintézis sebesség a külsőleg adott butyrobetailtől 7.13-ról 1.13 μ mol/min/g-ra csökkent az első 15 percben majd az egész 30 perces periódus alatt 6.23-ról 2.90 μ mol/min/g-ra. Ugyanezen tendencia volt megfigyelhető az állatok plazmájában (3. Ábra).

A következőkben megvizsgáltuk a FES 1 órás hatását az állatok karnitin szintjeinek alakulására, vizsgálva ezáltal az endogen előanyagokból való bioszintézisre és az összkarnitinen belül az észter megoszlásra gyakorolt hatást. (Ez esetben tehát nem radioaktívítást mértünk, hanem enzimátikus analízist végeztünk a karnitin szintek mérése céljából, I. Táblázat).

I. 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) | *262 ±9.86 | **89 ±10.1 | **140 ±10.2 | **41.6 ±2.21 | 24.1 ±3.22 | 13.2 ±1.41 |

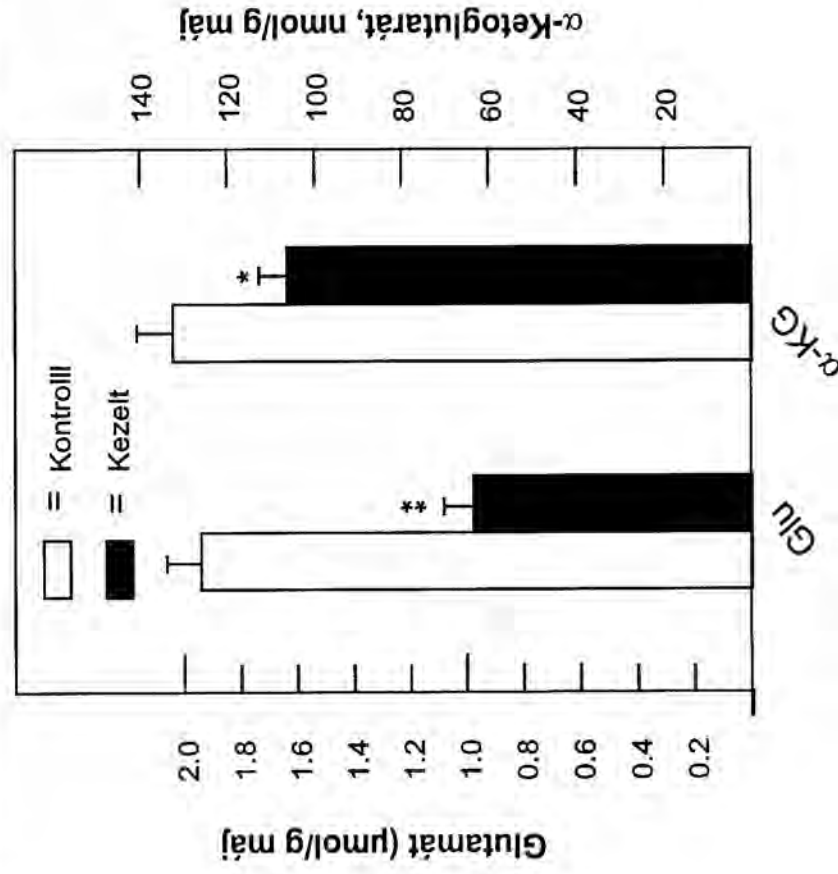
Az állatok 1.2 mmol/kg fenilecetsavat kaptak i.p. 60 perccel leölésük előtt. Az átlag±SEM értékek a zárójelben jelzett számú állatra vonatkoznak. Szignifikáns különbség a kontrollhoz képest: *p < 0.02; **p < 0.01. Rövidítések: RLK: rövid láncú acil-karnitin.

A plazmában az össz és a szabad karnitin mennyisége is csökkent, amíg az észterek részvételi aránya nem változott. A májban össz karnitin értéke kisebb mértékben, de szignifikánsan, 292 nmol/g-ról 262 nmol/g értékre csökkent. Tehát a karnitin bioszintézisének gátlása endogén prekursorokból (a vizsgált 1 óráig tartó hatás alatt) is megvalósult, amint azt a máj és plazma értékek tükrözik.

Ugyanakkor a májban az észteresítés fokában következett be lényeges változás FES hatására: a rövid láncú karnitínészterek mennyisége 82.5 nmol/g kontroll értékről 140 nmol/g-ra emelkedett a szabad karnitin rovására, amelynek szintje 186 nmol/g-ról 89 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 kérdésre vizsgálatára, amely munkám lényeges részét képezi, a 1.3 pontban térek vissza.

1.2. A Fenilecetsav okozta karnitin szintézis gátlás lehetséges mechanizmusa

4. Ábra. A Fenilecetsav hatása a glutamát és α -ketoglutarát szintekre patkány májban.



Az állatok 1.2 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. * $P < 0.02$; ** $P < 0.01$.

Miután a FES az izolált Bu hidroxiláz enzimet *in vitro* nem gátolta, az *in vivo* tapasztalt gátlás mechanizmusának kiderítése céljából megvizsgáltuk a Bu hidroxiláz kofaktorainak mennyiségében történt esetleges változást FES hatására, hasonlóképpen a Valproát esetéhez (15). 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 (15). A FES hatását ezen metabolitokra a 4. Ábra mutatja

Mint az ábrán látható, az α -KG szint csökkent 132.6 nmol/g-ról 107.4 nmol/g-ra. A csökkenés a Glu szintben (amely a transzamináz és a Glu dehidrogenáz reakciókban α -KG partnere) még drasztikusabb volt, 1.95 μ mol/g kontroll értékről 0.96 μ mol/g-ra csökkent. Az aszkorbinsav szintben nem történt változás (nem ábrázolt adat).

I.3. A Fenacetil-karnitin (FEAK) létének bizonyítása FES-val kezelt patkány

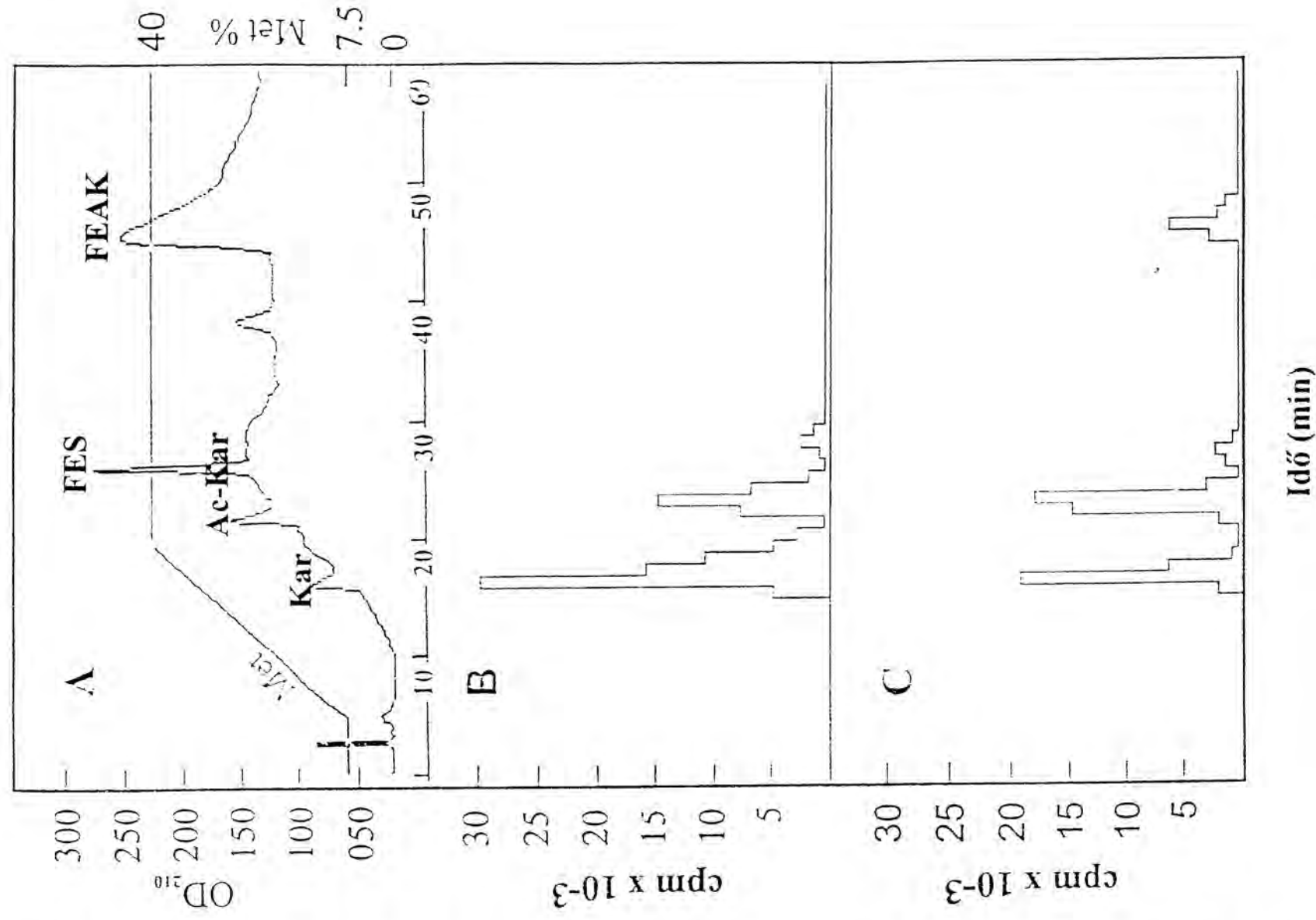
májában

Az I. Táblázat értékelésekor már utaltunk arra, hogy a FES kezelt állatok májában megfigyelt jelentős rövidláncú acil-karnitin növekedés lehetséges, hogy részben FEAK képződésének tulajdonítható, amely kémiai tulajdonságai, oldékonysága révén (lásd "Anyagok és Módszerek" fejezet, *Metabolitok analízise*) szintén a rövidláncú karnitin észterek csoportjába kerül.

A kérdés eldöntésére alkalmazott egyik módszerünk a HPLC-vel történő azonosítás volt (5. Ábra).

5. Ábra. (A) A standard preparátumok elució profilja. 100 μ l A oldatban 100 μ g karnitin (Kar), 100 μ g acetil-karnitin (AcKar) és 10 μ g fenacetil-karnitin (FEAK) volt feloldva és injektálva. A metanol (Met) gradienst az ábra mutatja. FES: szabad fenilecetsav, amely a FEAK preparációból származik. (B) Reprezentatív elució profilja egy kontroll állatból származó májmintának. Az állat karnitin "pool"-ja előzőleg tríciummal lett jelölve (lásd "Anyagok és Módszerek"). 100 μ l A oldatot (125 mg szövet) injektáltunk a készülékbe, amely összesen 1.2×10^5 cpm rádióaktivitást tartalmazott és amiből 1.05×10^5 cpm-t nyertünk vissza a jelölt csúcsokban. (C) Reprezentatív elució profilja egy májmintának egy állatból, amely ugyanúgy volt kezelve, mint a (B) alatti, azzal a különbséggel, hogy leölés előtt 1 órával 1.2 mmol per kg FES-t kapott. Az injektált 100 μ l A oldat összesen 1.0×10^5 cpm rádióaktivitást tartalmazott, amiből 9.20×10^4 cpm-t nyertünk vissza a jelölt csúcsokban. Kar: karnitin; Ac-Kar: acetilkarnitin; FES: fenilecetsav; FEAK: fenacetilkarnitin.

5. Ábra. A FEAk azonosítása HPLC-vel FES-val kezelt putkány májában.

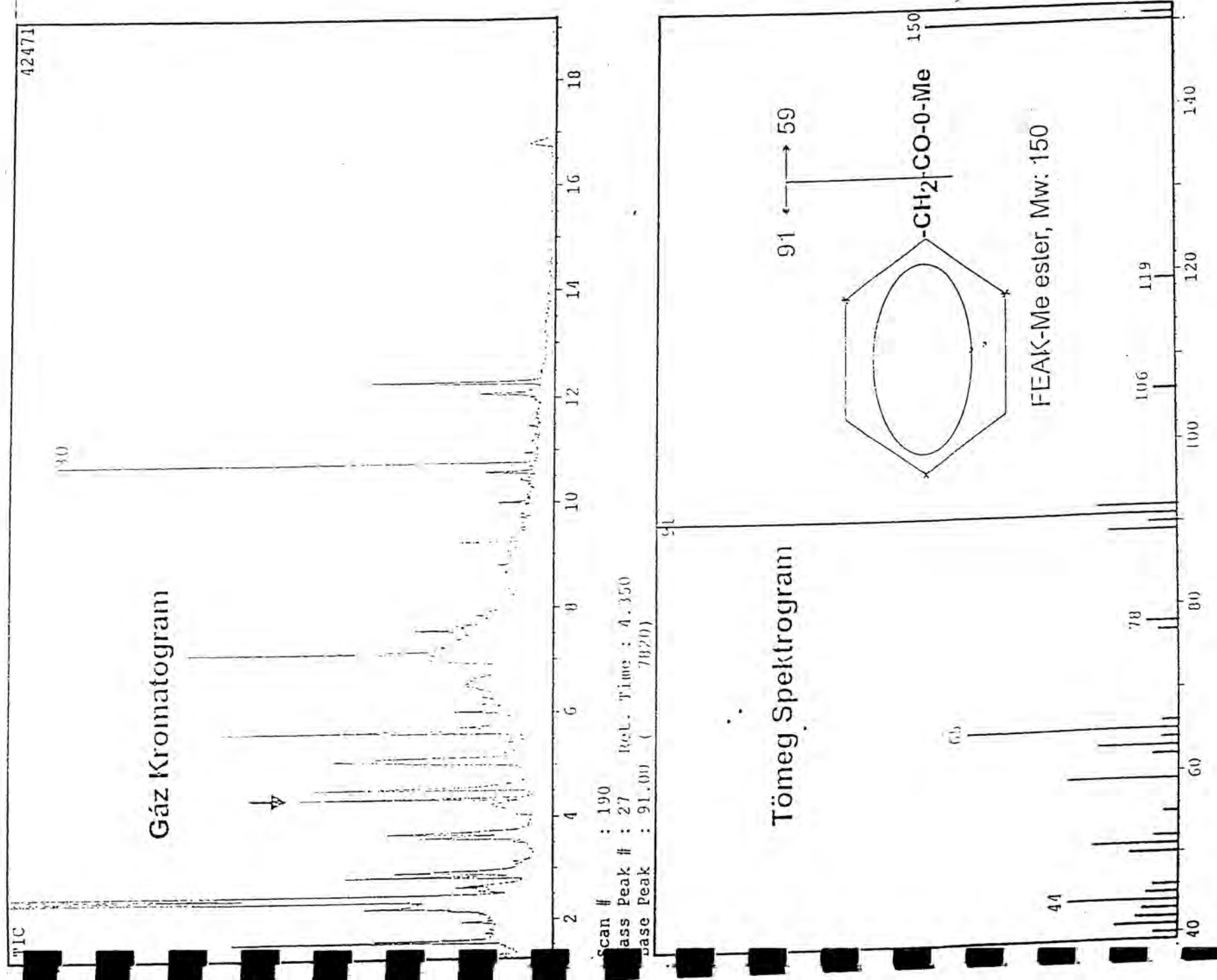


A kontroll állat radioaktív elució profilján (Fig. 5/B) az injektált 1.2×10^5 cpm radioaktivitásból a csúcsok alatti frakciók radioaktivitását összeadva 71,000, 29,000 and 5,000 cpm-et azosítottunk mint szabad karnitint, acetyl-karnitint valamint propionil-karnitint. (Bár a propionil-karnitint standard jelen kísérletben nem szerepel az A panelben, a kis csúcsot minden bizonnyal tekinthetjük propionil-karnitinnak, korábbi tapasztalataink alapján (26). Az ugyanilyen szeparáció eredményeként, amikor az 1.0×10^5 cpm aktivitású minta egy olyan állatból származott, amely előzőleg FES-kapott (Fig. 5/C), 33,900, 39,700 és 4,900 cpm aktivításokat detektáltunk mint szabad karnitint, acetyl-karnitint valamint propionil-karnitint. Összehasonlítva a kontroll állat adataival (panel B) látható, hogy az acetyl-karnitint aránya jelentősen megnőtt az össz karnitinen belül, összhangban az I Táblázat adataival. Továbbá, ebben a mintában detektáltunk egy újabb 13,900 cpm aktivitású csúcsot, a többiekől jelentős távolságra, a FEAK retenció idejének megfelelően. A mennyiségi számításokat elvégezve kitűnik, hogy a FES kezelt állatban 1 óra múlva az össz karnitint mintegy 15%-a volt FEAK formájában.

A FEAK létének további megerősítésére gázkromatográf-tömegspektrográf (GC-MS) módszert alkalmaztunk. A FES-val kezelt patkánymájából gyantán való speciális előkezelés után nyert gáz kromatogrammot és a FES csúcs tömegspektrumát mutatja a 6. Ábra.

6. Ábra. Az ábra a kationcserélő gyantáról lúgos alkohollal eluált anyagok spektrumát mutatja. Az ábra felső része a gázkromatogrammot (Total Ion Chromatogram, TIC) mutatja, amelyen nyíllal jelöltük a FES helyét. Az összes detektált anyag, így a FES is eredetileg kationhoz kötött sav, (vagy ön maga kation) kellett, hogy legyen. A részletes magyarázatot illetően az "Anyagok és Módszerek" fejezet *Gáz kromatográf tömegspektrográf (GS-MS) analízis* részére utalunk. Az ábra alsó része a TICből kiválasztott FES tömegspektrumát mutatja. A két fő tömegszám, a 150 és 91 keletkezését az ábra magyarázza.

6. 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-ot csak közvetetten tudtuk kimutatni, lényegében azt mondhatjuk, hogy a FES kationhoz, nagy valószínűséggel karnitinhoz kötődött. További bizonyítékul, hogy a kation valóban karnitin volt, végeztük a következő kísérletet, amelyben a patkány máj karnitin szintjét Bu előkezeléssel jelentősen megemeltük, és vizsgáltuk, most mennyi FES kötődik a "kationhoz"? Az eredményt a II. Táblázat mutatja.

II. Táblázat. FEAk képződése FES-val kezelt patkányok májában.

| Állatcsoport | Máj össz karnitin | | relatív önkényes egység | |
|--------------|-------------------|-------------|-------------------------|-------------|
| | 91-es tömeg | intenzitása | 150-es tömeg | intenzitása |
| 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 | |

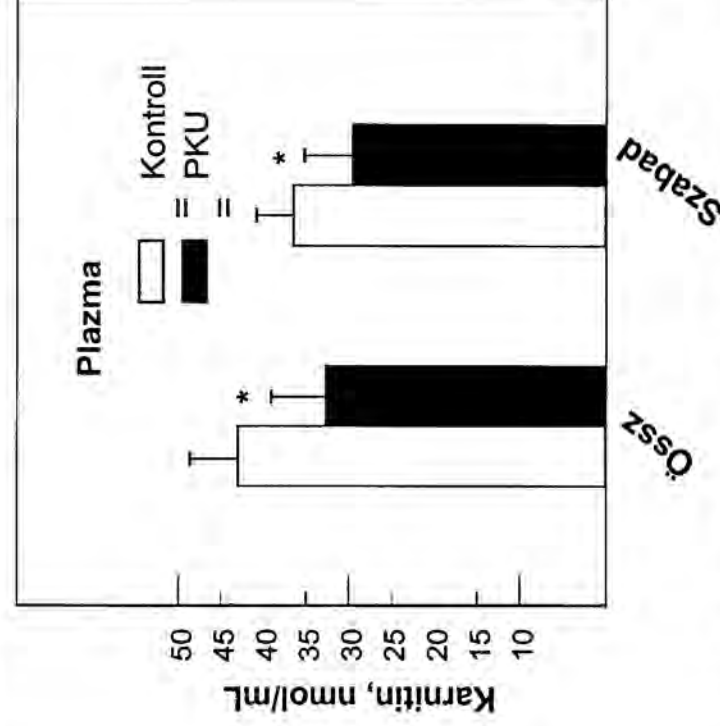
Két patkány (I,II) 1.0 ml fiziológiás só oldatot kapott i.p. (FES csoport), másik kettő (III,IV) 1 mmol Bu-t kapott 1.0 ml sóoldatban (FES plusz Bu csoport) 5 órával leölésük előtt. 1 órával leölésük előtt az összes állat kapott 1.2 mmol per kg of FES-t. A semlegesített 100 µl metanol-HCl oldatból (amely 125 mg eredeti máj szövetet reprezentált) 1 µl-t injektáltunk a GC-MS készülékbe. További részleteket illetően lásd az "Anyagok és Módszerek" fejezetet és a 6. ábra leírását. Rövidítések: FEAk, fenacetilkarnitin; FES, fenil ecetsav; Bu, butirobetain.

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

I.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 7. Ábra mutatja.

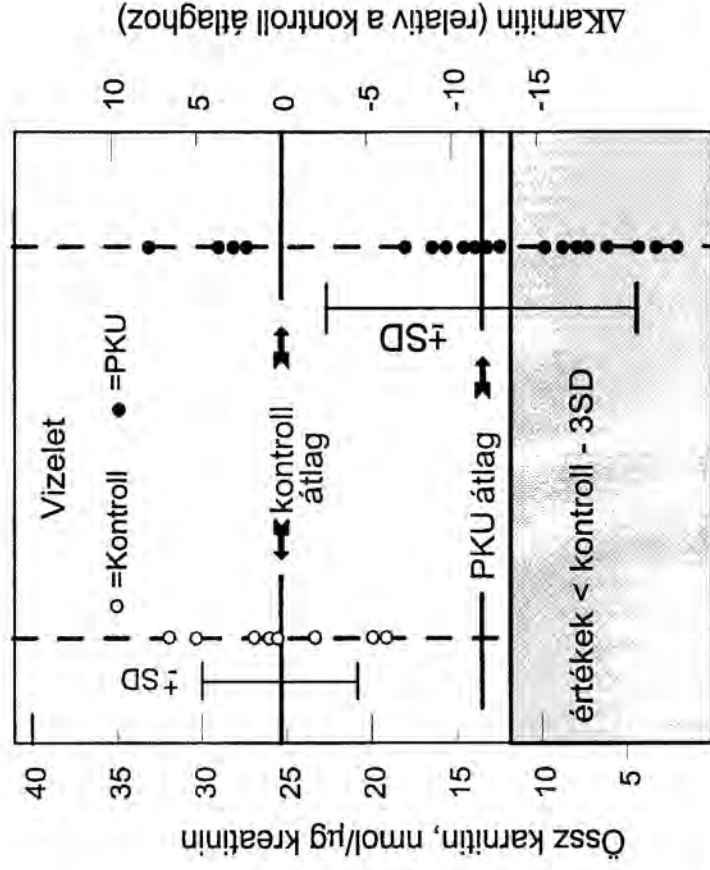
7. Ábra. Az össz és szabad karnitin szintek PKU betegek plazmájában.



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 7. Ábra mutatja a betegek plazmájában enyhé, 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 (8. Ábra).

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



Minden kör egy önnálló 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 7. Ábrában szerepeltekkel.

Mint az Ábrán látható (8. Ábra) a vizeletben történő karnitin meghatározásnál eredetileg nagyobbak az egyének közötti különbségek a kontrolloknál is, ezért az egyes betegeket 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 7. és a 8. Ábra adatainak összevetéséből megállapíthatjuk, hogy a PKU betegek plazmájában a csökkent karnitin szintet nem egy fokozott ürítés okozza.

I.5. FEAk a fenilketonuriában szenvedő betegek vizeletében

A következő izgalmas kérdés, előfordul-e FEAk a PKU betegek vizeletében is? (Ennek vizsgálatára csak a GC-MS módszer jöhet szóba, mivel radioaktív jelölés nem történhetett). Az igenlő választ a III. Táblázatot adja meg. (A betegek közül csak kettő K.Z. és P.B, azonos a 7. és 8. Ábrában szereplőkkel). Vizsgáltuk továbbá (a II. Táblázatban feltüntetett patánykísérlethez hasonlóan), hogy karnitin adására nő-e a kimutatható FEAk mennyisége? (Ezen adatok egyelőre csak két beteg esetén állnak rendelkezésre). Látható, hogy a karnitin szuplementáció hatására, a jelentősen emelkedett karnitin ürítés mellett a FEAk mennyisége is megnőtt.

III. Táblázat. A FEAk kimutatása fenilketonuriás betegek vizeletében karnitin szuplementáció előtt és után

| Betegek | Szuplementáció előtt | | | Szuplementáció után | | |
|-----------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| | Össz karnitin nmol/ml | Tömeg intenzitás 91 | 150 önkéntes egység | Össz karnitin nmol/ml | Tömeg intenzitás 91 | 150 önkéntes egység |
| K. Z. (f) | 31.2 | 7,100 | 1,420 | 384 | 11,200 | 2,240 |
| P. B. (f) | 56.8 | 4,000 | 840 | 248 | 9,200 | 1,932 |
| K. T. (f) | 56.0 | 3,300 | 627 | 816 | 12,300 | 2,398 |
| U. M. (n) | 526 | 3,500 | 735 | 699 | 9,800 | 2,058 |
| H. D. (n) | 21.2 | 6,900 | 1,380 | 536 | 13,600 | 2,652 |
| B. A. (f) | 25.7 | 3,760 | 789 | 220 | 9,800 | 2,056 |
| L. A. (n) | 18.1 | 3,380 | 709 | 826 | 11,900 | 2,300 |

A betegek napi 1 g L-karntint kaptak orálisan 7 napig. f: férfi; n: nő; FEAk: fenacetil-karnitin.

(A rendelkezésre álló 1.0 ml plazmából FEAK nem volt kimutatható, és FES is csak két beteg, K.Z. és P.B. esetén, ami viszont érdekes módon a karnitin kezelés hatására eltűnt).

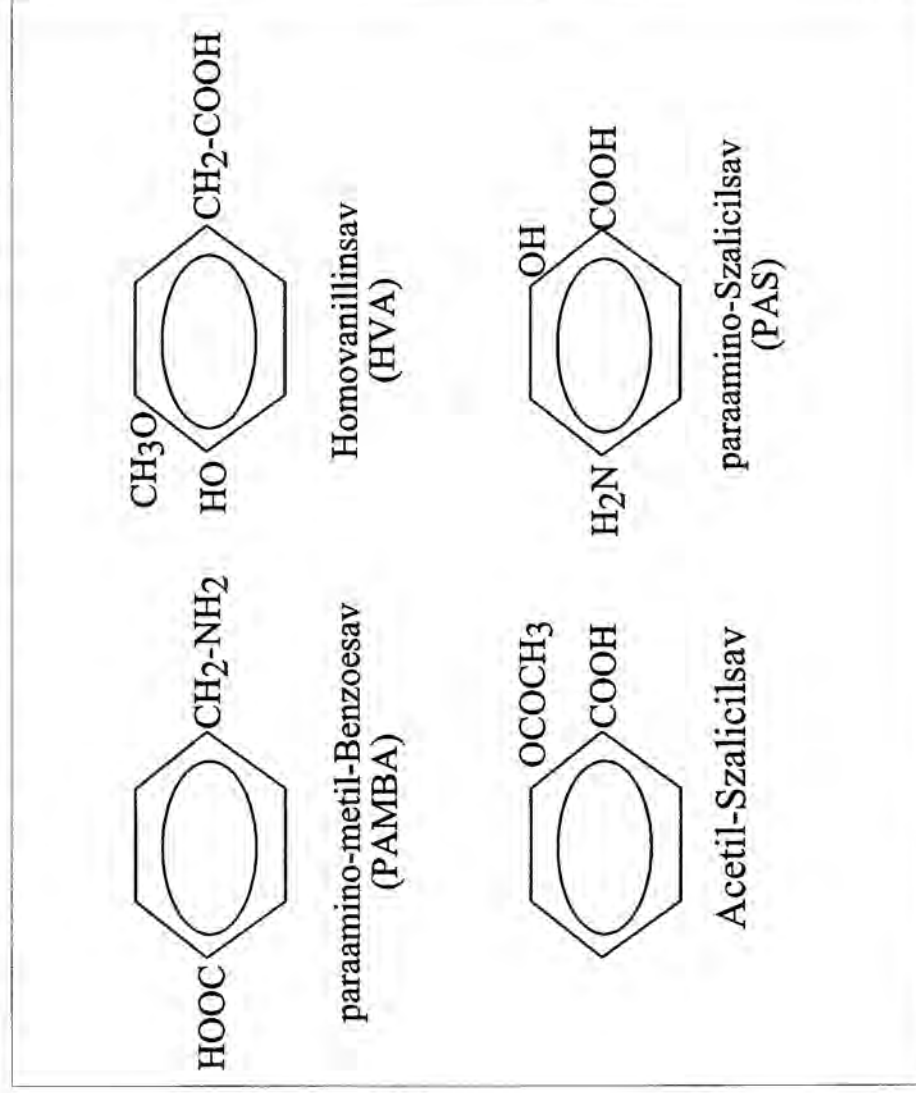
A kísérletek alapján megállapíthatjuk, hogy a Fenilecetsav patkányban gátolja a karnitin bioszintézisét a butirobetain-hidroxiláz enzimen keresztül történő fluxus gátlásával, és ezen hatást a az enzim egyik koenzimjének, az α -ketoglutarát szintjének a csökkentésén keresztül fejti ki. Kimutattunk továbbá egy eddig le nem írt vegyületnek, a Fenacetilkarnitin-nek a létezését Fenilecetsavval kezelt patkányok májában és PKU-ban szenvedő betegek vizeletében. Megfigyeltük továbbá, hogy a PKU-ban szenvedő betegek szérumában a karnitin koncentrációja kismértékben ugyan de szignifikánsan csökkent, míg a beteg többségének vizeletében az ürített karnitin mennyisége drasztikusan csökkent.

II. Benzoeshav analóg gyógyszerek hatása a karnitin bioszintézisre

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

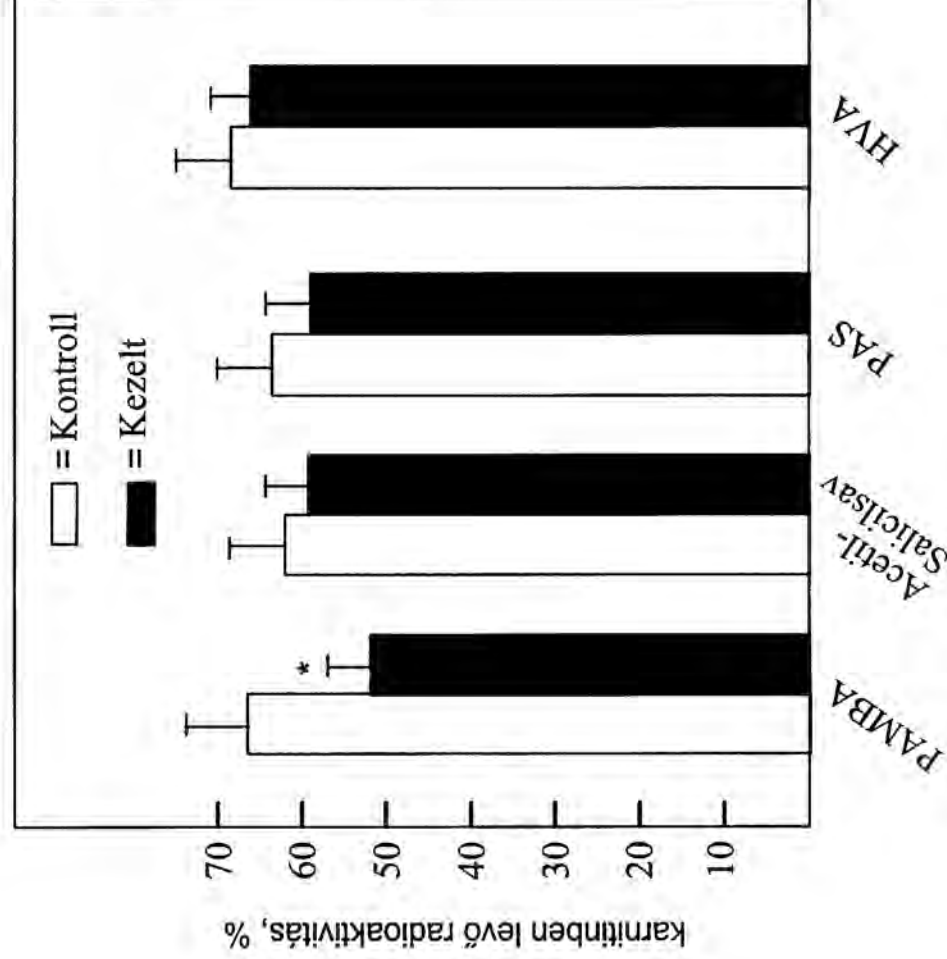
Miután laboratóriumunk előzőleg kimutatta, hogy a benzoeshav gátolja a karnitin bioszintézist (15), jelen munkámban pedig prezentáltam a FES hasonló hatását, munkahipotézisünknek megfelelően a továbbiakban benzolgyűrűt szintén tartalmazó gyógyszereket vizsgáltunk ilyen szempontból. A vizsgált gyógyszereket és terápiás hatásukat a "Tudományos előzmények" fejezetben listáztam, szerkezetüket a 9. "Ábra mutatja.

9.Ábra. A karnitin szintézisre való hatás szempontjából vizsgált gyógyszerek



Az anyagok esetleges hatásának megállapításához és a legaktívabb kiválasztásához, hasonlóképpen a fenilalanin lebontási termékek esetéhez, először a radioaktív butirobetainból való szintézist vizsgáltuk. Eredményeinket a 10. Ábra mutatja.

10. Ábra. Benzoesav analóg gyógyszerek hatása nyomjelző mennyiségű radioaktív butirobetain karnitinné való átalakulására patkány májában.

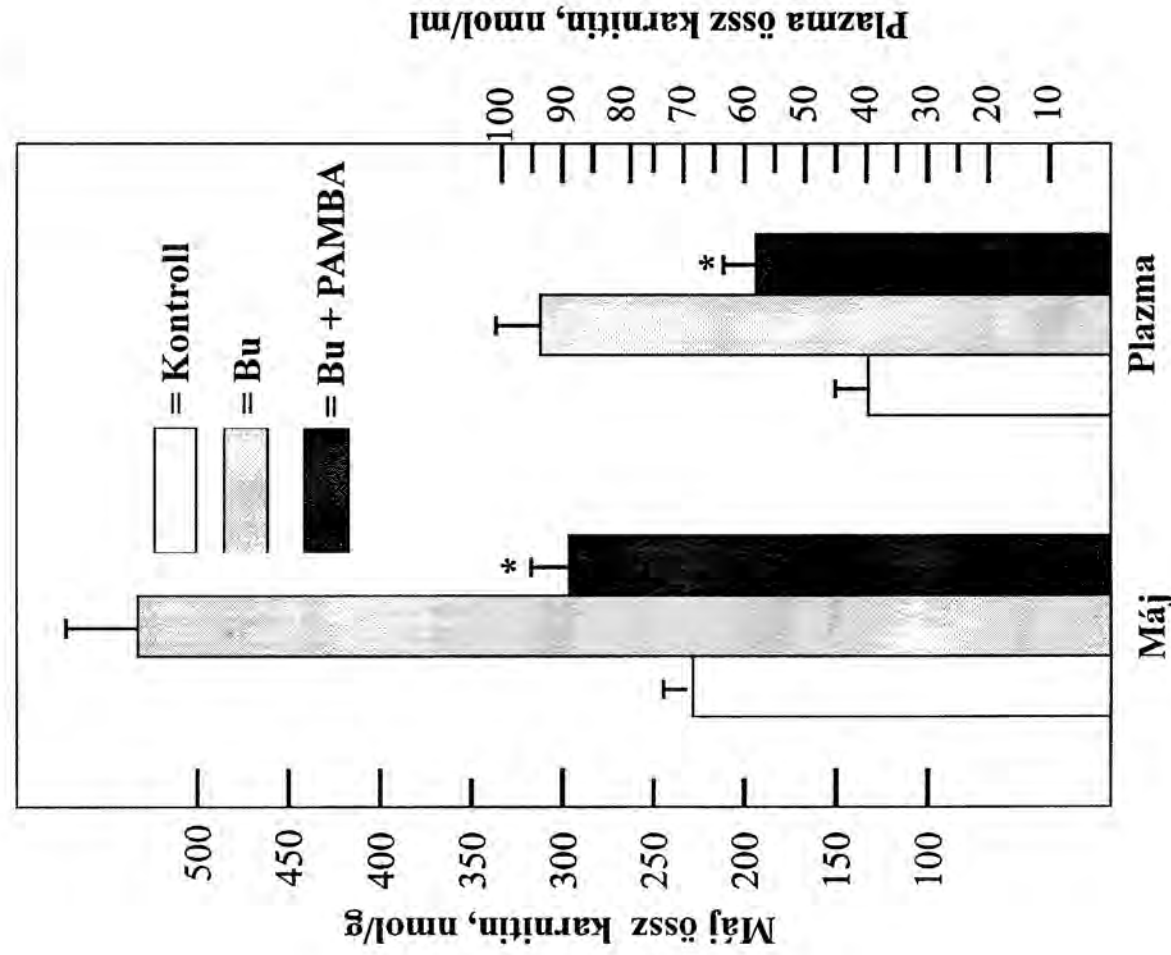


Az állatok 1.2 mmol/kg mennyiséget kaptak a feltüntetett vegyületekből i.p., 30 perc múlva az összes állatnak 1.5×10^7 cpm [^3H]Butirobetaint injektáltunk. 30 perccel az izotóp adását követően (60 perccel nevezett vegyületek adása után) az állatokat leöltük és 0.5 g májat analizáltunk radioaktivitás megoszlásra a butirobetain és karnitin között. Az oszlopok a kinyert összes radioaktivitás karnitinben talált százalékát jelzik (átlag \pm SEM) 5 állat esetében. * $P < 0.02$.

Mint látható, egyedül hatásosnak a PAMBA bizonyult, amelynek hatását a

továbbiakban részletesen vizsgáltuk. A következőkben, a radioaktív Bu-val végzett kísérletet megerősítendő, a terheléses mennyiségű jelöletlen Bu karnitinné való átalakulására való hatást vizsgáltuk (11. Ábra).

11. Ábra A PAMBA hatása terheléses mennyiségben adott jelöletlen butirobetain karnitin szintet emelő hatására patkány májában.

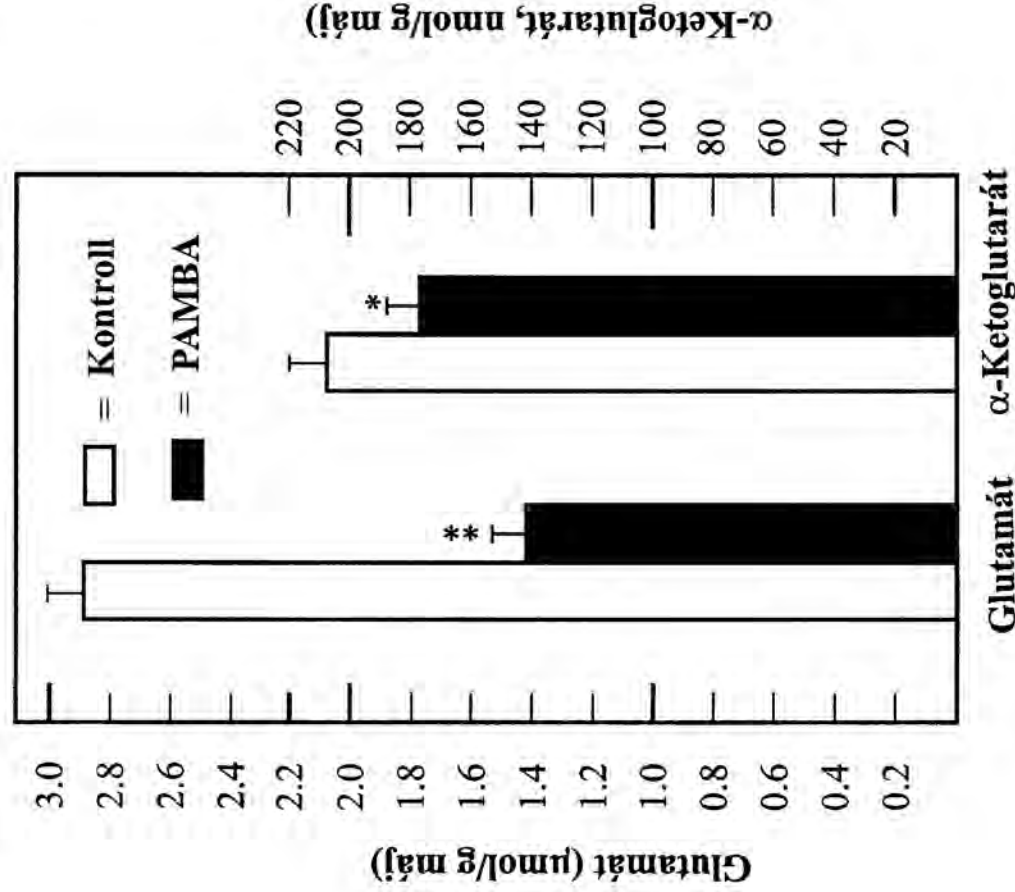


11. Ábra. A PAMBA-val kezelt állatok (Bu+PAMBA csoport) 1.2 mmol/kg/30 ml ivóvíz PAMBA-t kaptak a kísérletet megelőző 24 órán át. 30 perccel leölésük előtt a Bu és a Bu+PAMBA csoport 200 μ mol jelöltetlen butirobetailt (Bu) kapott. 30 perccel a Bu adását követően az állatokat leöltük, májukban és plazmájukban 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 Bu csoporthoz hasonlítjuk. Rövidítések: PAMBA, paraamino-metilbenzoesav; Bu: butirobetail.

II.2. A PAMBA okozta karnitin szintézis gátlásmechanizmusa

Hasonlóképpen a a Valproát (15) és a FES esetéhez, itt is az α -KG szint csökkenésére gondoltunk. Természetesen a Valproát (15) és a FES esetéhez, itt is az α -KG szint partner szubsztátok).

12. Ábra. A PAMBA hatása a glutamát és α -ketoglutarát szintekre patkány májban.



12. Ábra. Az állatok 1.2 mmol/kg/30 ml ivóvíz PAMBA-t kaptak a kísérletet megelőző 24 órán át.
* $P < 0.02$, $P < 0.001$.

Mint az Ábrán látható mind a Glu mind az α -KG szignifikánsan csökkent a PAMBA hatására. * $P < 0.001$; $P < 0.02$.

EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A disszertáció tervezetében leírt kísérletes munkák során megállapítottuk, hogy a Fenilecetsav, a kóros fenilalanin lebontás során felhalmozódó egyik termék, és a paraamino-metil-Benzoesav (PAMBA) nevű hemosztatisz gyógyszer gátolják a karnitin bioszintézisét. A bioszintézisre kifejtett gátló hatást döntően az α -ketoglutarát (α -KG) szint csökkentésének tulajdoníthatjuk, mivel az α -KG kofaktora a karnitin bioszintézis lépéseinek sorában szerepet játszó két hidroxilezési reakciónak is (13. Ábra).

Mint az ábrából látható (13. Ábra), a bioszintézisben két α -KG függő hidroxilezési reakció, a trimetillizin hidroxiláz és a butirobetain 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. és 10. Ábra), amit az α -KG szintjének csökkenése kísért. Az α -KG szintben történt változások (A FES esetén 132 nmol/g -ról 107 nmol/g-ra, 4. Ábra) hatékonyak lehetnek az enzimén keresztül történő *in vivo* fluxus csökkentésében, mivel ez a tartomány jóval az enzim a telítési szintje alá esik. Patkány máj Bu-hidroxiláz esetében 0.5 mmol/L K_M értéket írtak le α -KG-ra (30). A mért α -KG értékek a teljes sejtre vonatkoznak, a változás a citoszólban, Bu-hidroxiláz előfordulási helyén, még kifejezettebb lehet. Joggal feltételezhetjük továbbá, hogy az α -KG szint csökkenés a másik hidroxilező enzimén, a trimetillizin hidroxilázon keresztül történő fluxust is érinti, hozzájárulva ezáltal a Fenilecetsav és a PAMBA teljes *in vivo* gátló hatásának kifejtéséhez.

is. A vizsgált benzoosav analóg gyógyszerek, továbbá a fenilecetsav és a benzoosav szerkezetét összevetve úgy tűnik, hogy egy hidroxil csoport bevitele a karboxil csoport mellé (9. Ábra) felfüggeszti a karnitin bioszintézisre gyakorolt gátló hatást.

A Fenilecetsav karnitin szintézist gátló hatása jól összecseng egy nemrégiben megjelent közleménnyel (16), amely szerint az emberi terápiában is alkalmazott benzoosav kezelés (hiperglicinemia esetén) karnitin deficienciát okoz, valamint benzoilkarnitin képződik.

A FES kapcsán jelentősnek tartjuk a Fenacetil-karnitin létezésének felismerését, amelyet kétféle független módszerrel, HPLC-vel (Fig. 5) és GC-MS technikával (Fig. 6.) bizonyítottunk mind patkányban, mind emberben. A benzoilkarnitin (16) és a FEAK létezése azt bizonyítja, kell léteznie egy aromás savakat karnitinre transzferáló enzimnek, amelyet eddig még nem izoláltak és *in vitro* aktivitását sem mérték.

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, mikoris a vese az ürítés csökkentésével próbálja az elégtelen szintézist kompenzálni a plazma és szöveti karnitin szintek fenntartása végett.

A PKU kapcsán végzett vizsgáataink egy nyilvánvaló gyakorlati kérdést vetnek fel, a betegek karnitinnel való szuplementálását, amelyet a Valproát esetén munkacsoportunk már alkalmazott (14).

A PAMBA kapcsán a további vizsgálatok feladata a gyógyszer krónikusan szedő betegek karnitin státuszának vizsgálata.

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 Oxyaminoverbindungen, 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 vitam B₁ 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 Palmitoiltransferase. *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. 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.
14. Melegh B., Kerner J., Acsadi G., Lakatos J. and Sandor A.: L-carnitine replacement therapy in chronic valproate treatment. *Neuropediatrics* **21**, 40-43, (1990).
15. Farkas, V., Bock, I., Cseko, J. and Sandor, A. Inhibition of Carnitine Biosynthesis by Valproic Acid - The Mechanism of Inhibition. *Biochem. Pharm.* **52**, 1429-1433. (1996).
16. Vanhove J.L.K., Kishnani P., Muenzer J., Wenstrup R.J., Summar M.L., Brummond M.R., Lachiewicz 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)
17. Scriver C.R: Whatever happened to PKU? *Clin Biochem*, **28**: 137-144, (1995).
18. 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).
19. Ingalls S.T, Hoppel CL and Turkaly JS, Synthesis of radiatively methyl-labelled (l)-carnitine *J Labell Comp Radiopharm* **8**:535-541, (1981).
20. Cederblad G. and Linstadt S.: A method for the determination of carnitine in the picomolar range. *Clin. Chim. Acta* **37**, 235-243 (1972).
21. Brass EP and Hoppel CL, Carnitine metabolism in the fasting rat. *J Biol Chem* **253**:2688-2693, (1978).
22. 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).
23. 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).

24. Bessey, OA. *J. Biol. Chem.* **125-126**, 771-778 (1938)
25. 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).
26. 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).
27. Kumps A, Duez P, Mardens Y: Gas chromatographic profiling and determination of urinary acylcarnitines. *J. Chrom.* **658**: 241-248, (1994).
28. Sandor A, and Hoppel C.L.: Butyrobetaine availability in liver is a regulatory factor for carnitine biosynthesis in rat. *Eur. J. Biochem.* **185**, 671-675 (1989)
29. Sandor A. Butyrobetaine is equal to L-carnitine in elevating L-carnitine levels in rats. *Biochem. Biophys. Acta.* **1083**, 135-138, (1991).
30. Lindstedt G. and Lindstedt S.: Cofactor requirements of γ -butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **245**, 4187-4192 (1970).
31. Landau BR, Schumann, WC, Chandramouli, W., Magnusson, I., Kumaran, K., Wahren, J. 14C-labeled propionate metabolism in vivo and estimates of hepatic gluconeogenesis relative to Krebs cycle flux. *Am. J. Physiol.* **265**, E636-647 (1993).

JELÖLT PUBLIKÁCIÓI

Absztraktok:

1995:

Investigation of dideoxycytidine-induced cardiomyopathy in rats (Skuta G., Csete B., Fischer G., Nemeti B., Sümegi B.)
TDK-konferencia, Pécs, 1995

The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on carnitine biosynthesis (Fischer G., Debreceeni B., Farkas V., Sándor A.)
XXV. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1995

The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on carnitine biosynthesis (Fischer G., Debreceeni B., Farkas V., Sándor A.)
2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, 1995

1996:

The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on carnitine biosynthesis (Fischer G., Debreceeni B., Farkas V., Sándor A.)
XXVI. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1996

1997:

Drug-induced cardiomyopathy in rats (Csete B., Fischer G., Skuta G., Sümegi B.)
3rd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Pécs, 1997

The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on carnitine biosynthesis (Fischer G., Debreceeni B., Farkas V., Sándor A.)
13th International Ph.D Student Congress of Medical Sciences Istanbul, 1997

The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on carnitine biosynthesis (Fischer G., Debreceeni B., Farkas V., Sándor A.)
XXVII. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1997

1998:

G. Fischer, V. Farkas, B. Debreceeni and A. Sándor "THE EFFECT OF CATABOLIC PRODUCTS OF PHENYLALANINE METABOLISM ON CARNITINE BIOSYNTHESIS" 30th Conference of Hungarian-American Medical Association, 1998,

Sarasota (Florida).

The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on carnitine metabolism in patients with PKU. (Fischer G., Debrecei B., Farkas V., Sándor A.) XXVIII. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1998

Előadások

1996:

DDC indukált cardiomyopathia vizsgálata patkányban (Csete B., Fischer G., Skuta G., Sümegi B.)
XXVI. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1996

Drug-induced cardiomyopathy in rats (Csete B., Fischer G., Skuta G., Sümegi B.)
1st International Symposium on Myocardial Cell Protection, Pécs, 1996

1997:

Lipoamide Modulates the Reactive Oxygen Intermediates Mediated Intracellular Signaling in Postischemic Perfused Rat Heart (Szabados E., Fischer G., Kispál Gy., Sümegi B.), 1997

1998:

Lipoamid hatása a reaktív oxigén-speciessé mediált intracelluláris jelátvitelre izolált perfundált patkányszíven (Szabados E., Fischer G., Kispál Gy., Sümegi B.)
Magyar Kardiológus Társaság 1998. évi Tudományos Konferenciája, Balatonfüred, 1998

Közlemények:

Eszter Szabados, Gabor M. Fisher, Kalman Toth, Bela Csete, Balazs Nemethi, Karoly Trombitas, Tamas Habon, Gora Endrei, and Balazs Sumegi, Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. (1999), *Free Radical Biol. Med.*, **26**, 309-317.

Eszter Szabados, Gabor M. Fisher, Ferenc Gallyas Jr., Gyula Kispal and Balazs Sumegi, Enhanced ADP-ribosylation and its diminution by lipoamide following ischemia-reperfusion in perfused rat heart (1999), *Free Radical Biol. Med.* (1999) 27,

1103-13.

Gabriella Skuta, Gabor M. Fischer, Pal Szabó, and Balazs Sumegi, Molecular mechanism of short term cardio toxicity caused by 2',3'-dideoxy cytidine (ddC): Modulation of reactive oxygen species levels and ADP-ribosylation reactions. *Biochem. Pharm.* (1999), 58, 1915-25..

Gabor M. Fischer, Viktoria Farkas, Balazs Nemethi, Balazs Debrececi, Aranka Laszlo, Zsuzsa Schaffer and Attila Sandor, Carnitine metabolism in phenylacetic acid-treated rats and in patients with phenylketonuria. *Biochim. Biophys. Acta.* (megjelenés alatt).

Gabor M. Fischer, Balazs Debrececi, Viktoria Farkas, Attila Sandor, Some benzoic acid analogue drugs impairing carnitin biosynthesis in rats. *J. Pharm. Exp. Ther.* (közlésre beterjesztve).