

Egyetemi Doktori (PhD) értekezés

Tézisei

**A KARNITIN ANYAGCSERÉJE
FENILECETSAVVAL KEZELT
PATKÁNYOKBAN VALAMINT
FENILKETONURIÁBAN SZENVEDŐ
BETEGEK BEN**

dr. Fischer Gábor

Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvosi Kar

Biokémia Intézet

2000

Programvezető:

dr. Sümegi Balázs

Témavezető:

dr. Sándor Attila

TARTALOMJEGYZÉK

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
CÉLKITŰZÉSEK	5
MÓDSZEREK	6
MEGÁLLAPÍTÁSAINK	11
I. A fenilalanin lebontás metabolitjának hatása a karnitin bioszintézisre	11
I. 1. <i>A gátlást mutató metabolit kiválasztása, a gátlás bizonyítása</i>	11
I. 2. <i>A Fenilecetsav okozta karnitin szintézis gátlás lehetséges mechanizmusa</i>	12
I. 3. <i>A Fenacetil-karnitin (FEAK) létének bizonyítása patkány májában</i>	13
I. 4. <i>Fenilketonuriában szenvedő betegek karnitin státusza</i>	17
I. 5. <i>FEAK a fenilketonuriában szenvedő betegek vizeletében</i>	18
II. Benzooesav analóg gyógyszerek hatása a karnitin bioszintézisre	19
II. 1. <i>A gátlást mutató gyógyszer kiválasztása</i>	19
II. 2. <i>A PAMBA okozta karnitin szintézis gátlás mechanizmusa</i>	19
AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	19
JELÖLT PUBLIKÁCIÓI	22

TUDOMÁNYOS ELŐZMÉNYEK

Az L-karnitint (L-3-OH-4-N-trimetil-aminobutírat), mint az izomszövetben jelentős mennyiségben előforduló vegyületet, 1905-ben fedezték fel 1927-ben tisztázták kémiai szerkezetét (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 *Tenebriora* utal) a zsír felszaporodik és a lárvá ennek következtében "zsír-halált" hal, mert nem tudja saját zsírraktárait éhezéskor tápanyagforrásként felhasználni. A kutatásoknak további ösztönzést adott Fritz felismerése, hogy a karnitin patkánymáj homogenizátumban is nagymértékben fokozza a zsírsavak oxidációját.

A karnitinről való alapvető ismereteink lényegét röviden a következőkben foglalhatjuk össze. Az L-karnitin az összes állatfajban, számos mikroorganizmusban és növényben előfordul. Két lehetséges sztereoisomer 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 enzimikus reakció, amiben a karnitin molekula részt vesz, tehát katabolizmusa nincs, változatlanul vagy acil-karnitin formájában ürül a vizelettel. A transzferált zsírsav lánchosszúsága 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 lánchosszúságú zsírsavak számára. Lokalizációja mitokondrium, peroxiszóma 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 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 acil-karnitin a mitokondrium belső membránjában lévő karnitin transzlokáz segítségével bekerül a mátrixba egy eszetranszport folyamatban, miközben egy szabad karnitin molekula lép ki. A mátrixba bejutott acil-karnitinnel az acilcsoportot a CPT II CoA-ra transzferálja, a CoA észter pedig a β -oxidáció folyamatában feldarabolódik acetyl-CoA egységekre és eléghet.

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

1. A rövidláncú aciltranszferáz (CAT) segítségével az acetylcsoportokat átveszi a CoA-ról, növelve ezáltal a szabad koenzim A koncentrációját, mely alapvetően fontos egyéb enzimreakciók (piruvát dehidrogenáz, citrát kör) számára.
2. Szintén a CAT és a COT segítségével kórosan jelenlévő és felszaporodott (esetleg artifizialis) 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 legelmeletibb biokémiától (pl. enzimkémia) a klinikai gyakorlatig terjednek. A kutatásokat az első karnitin deficiencia okozta körkép felismerése terelte gyakorlati irányba, amely mai ismereteink és osztályzásunk szerint elsődleges karnitin deficiencia volt. Ismeretesek továbbá a másodlagos karnitin deficienciák, melyek anyag-cserebetegségekhez társulnak (pl. aminoaciduriák) vagy lehetnek egyes gyógyszerek által okozott artifizialisak. 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 proteinnel kötött trimetilizim. A szintézis útját az 4.

Ábra mutatja

A szintézisben résztvevő két hidroxilező enzim ko-subsztrátként 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 hidroxilező végző enzimet, a butirobetain-hidroxilázt (EC 1.14.11.1.), ami egyes fajokban (ember, hősög, nyúl, majom és macska) a májban és a vesében, más fajok esetében (egér és patkány) csak a májban fordul elő. Az enzimre jelen dolgozat szemelvényéből külön felhívom 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.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

Bu: Butirobetain; CoA: koenzim A; CPT: karnitin palmitoil-transzferáz; FEAK: Fenacetil-karnitin; FES: Fenilecetsav; HPLC: high pressure liquid chromatography; i.p.: intraperitoneális; α -KG: α -Ketoglutarát; PKU: Fenilketonuria; GC-MS: Gáz kromatográf-tömegspektrográf; RLK: Rövid Láncú Acilkarnitin; HLK: Hosszú Láncú Acilkarnitin

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

aszorbinsav 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 (FFAK) létének bizonyítása patkány májában, esetleg PKU betegek vizeletben
- A benzooesav analóg gyógyszerek közül kipróbáljuk 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 munkabizottság szerint vizsgálva. Vizsgáljuk továbbá, megfigyelhető-e struktúra-hatás összefüggés a fenti gyógyszerek esetén.

MÓDSZEREK

Betegek

A PKU betegek plazmát és 24-órás gyűjtött vizeletét a SZOTI Gyermekklinika (dr. László Aranka) és a budapesti PKU centrum (dr. Schuler Ágnes) boesátotta 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 mg% 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 10 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 ivóvizükben kapták. 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 1.5×10^7 cpm

[3 H]Butirobetaint adtunk. Az állatokat enyhe anesztézia után dekapitálással

ottuk le, a vért heparinizált csövekbe gyűjtöttük, a májakat és egyéb vizsgált szerveket pedig frissen folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk analízisig.

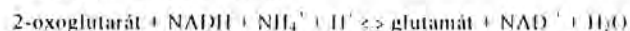
Metabolitok analízise

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

1./ A karnitin és észtereinek meghatározása. A karnitint radioizotopos enzimatisz analízissel határoztuk meg, amelynek elve röviden a következő: [1 - 14 C]Acetil-CoA-ról CAT enzim segítségével az [1 - 14 C]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 x 8, Cl^- formában) átfolyatjuk, a feleslegben maradt erősen savas [1 - 14 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 lánc hosszúságig oldódnak 0.5 N perklórsavban, a hosszúláncú 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 meghatározzuk a savoldható össz karnitin értéket kapjuk. A kettő különbsége a rövidláncú acil-karnitin. A kicsapott fehérjével együtt az üledékben maradt hosszúláncú karnitin észtereket (főleg palmitoil- és oleil-karnitin) szintén lúgos hidrolízissel alakítjuk szabad karnitinné és így határozzuk meg. Munkám során össz karnitin értéken a három frakció összegét értem.

2./ β -Glutamát (Glu) és α -KG meghatározása. Nevezett szubsztrátokat semlegesített perklórsavas 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 vagy a Glu-t.

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

Folyadékkromatográfias (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 butirobetain és a radioaktív karnitin arányát.

A minta feldolgozása és az elválasztás alapvetően a korábban leírtak szerint történt. 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 izolálendő anyagainkat NH₄OH tartalmú sómentes vizes oldatban kapjuk, melyet levegő fúvatással 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 fázisú 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 SupelcosilTM LC-18 volt 5 μ m részecske mérettel (Supelco). Az eluens pH 2.5 Na-foszfát volt 5 mM 1-heptánszulfonsav ion-pár reagenssel. Az eluens 7.5% (v/v) metanol 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 gradienst a fenti A és B oldatból alacsony nyomású gradiens "controller" segítségével hoztuk létre. Úgy mint az előzőekben, az eluciós sebesség 1.0 ml/min volt, az elúciót fotometriásan követtük 210 nm-en és 1.0 ml frakciókat gyűjtöttünk scintillációs "vial"-okba.

Az állatok 5 \times 10⁷ 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, megfelel 250 mg eredeti szövetnek) tisztítás céljából Dowex 50W NH₄⁺/Dowex 1 F⁻ kombinált ioncserélő gyantára tettük fel és az előzőleg közölt módszer szerint kezeltük. A végső eluátumot vákuum centrifugálással (Speed-Vac apparátus) pároltuk szárazra és 1.0 ml -20^o C abszolút metanolban felvettük, centrifugáltuk, a szupernatánt ismét bepároltuk és az üledéket 200 μ l 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, acetil-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 leirtak szerint detektáltuk. 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% etanoiban lévő 2 N ammónium 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) is bizonyítottuk (Mütermék 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 µl, vizeletminta esetén 200 µl metanol:HCl ben, ledugaszolt üvegcsőben történt 1 órán keresztül 60^o C-on való hevítéssel, amit 1 N KOH-dal való semlegesítés és centrifugálás követt. Rendszerint 1 vagy 2 µl tiszta felüliszót injektáltunk a készülék "splitless" üzemmódban lévő 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^o C volt, a kemence hőmérséklet programja a következő volt: 72^o C 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 He₂ gáz áramlási sebessége 1.0 ml/perc volt.

MEGÁLLAPÍTÁSAINK

1. A fenilalanin lebontás metabolitjainak hatása a karnitin bioszintézisre

1.1. 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 [³H] Bu adást követően a májban lévő radioaktivitás 60-70%-a jelenik meg karnitinben.

Valproáttal végzett korábbi kísérleteink során kiderült, hogy a benzooesav 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 anyagcseréjére irányult. A Phe lebontás vizsgálatának jelentőségét, annak humán patológiai vonatkozásait a bevezetésben már hangsúlyoztuk. A fenilalanin lebontás három intermedierét, a fenilpiruvátot, FES-t és homogentizinsavat teszteltük. 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. Ezért a továbbiakban részletesen a FES hatását tanulmányoztuk.

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 Bu-t adtunk az állatoknak, amely ismert módon gyorsan karnitinné alakul, jelentősen növelve ezáltal a karnitin szintet az állatok szöveteiben. Az állatok kezelésének protokollja ugyanaz volt mint az előző kísérletben, azzal a különbséggel, hogy a radioaktív Bu helyett 200 µM (30 mg) jelöletlen Bu-t injektáltunk és az állatok egy csoportját 15 perc, egy

másik csoportját 30 perc múlva öltük le. Megállapítottuk, hogy a FES a jelölletlen Bu hatására bekövetkezett karnitin szint emelkedést igen jelentős mértékben gátolta.

A következőkben megvizsgáltuk a FES 1 órás hatását az állatok karnitin szintjeinek alakulására, vizsgálva ezáltal az endogén előanyagokból való bioszintézisre és az összkarnitimen belül az észter megoszlásra gyakorolt hatást. (Ez esetben tehát nem radioaktivitást mértünk, hanem enzimatiszus analízist végeztünk a karnitin szintek mérése céljából. Megállapítottuk, hogy 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, 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 karnitineszterek mennyisége 82.5 nmol/g kontroll értékről 140 nmol/g-ra emelkedett a szabad karnitin rovására. 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

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, így az α -KG és a Glu és az aszkorbinsav mennyiségében történt esetleges változást FES hatására. Megállapítottuk, hogy 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.

1.3. A Fenacetil-karnitin (FEAK) létének bizonyítása FES-val kezelt patkány májában

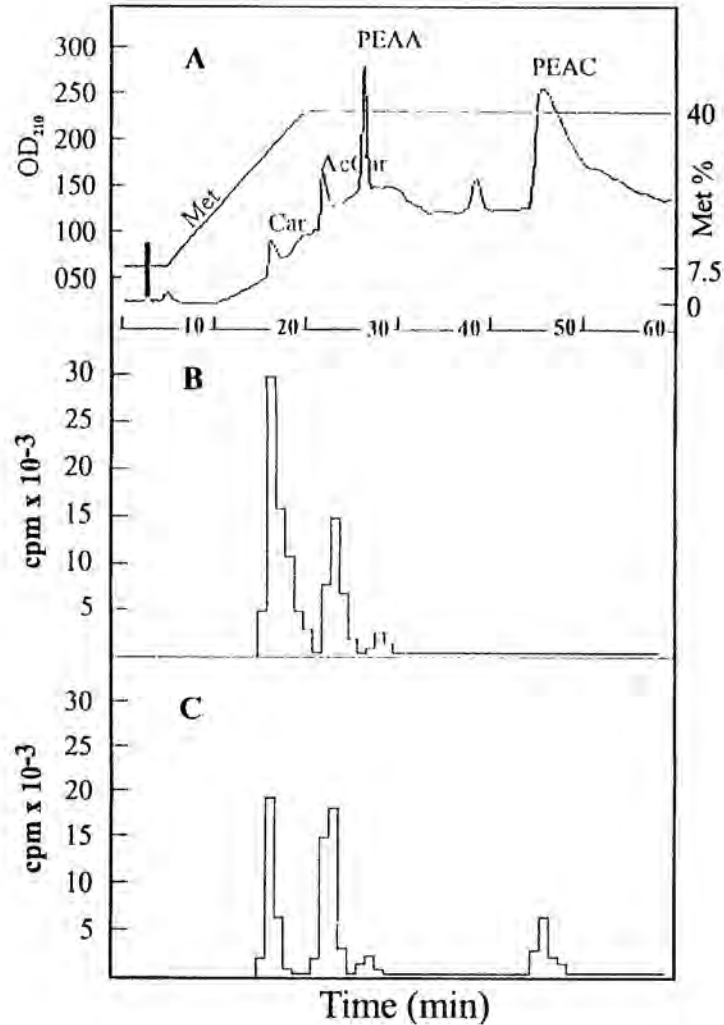
Az 1.1. pontban már utaltunk arra, hogy a FES kezelt állatok májában megfigyelt jelentős rövidláncú acil-karnitin növekedés lehetséges, hogy részben FEAK képződésének tulajdonítható. A kérdés eldöntésére alkalmazott egyik módszerünk a HPLC-vel történő azonosítás volt (1. Ábra).

1. Ábra. A FEAK azonosítása HPLC-vel FES-val kezelt patkány májában.

1. Ábra. (A) A standard preparátumok elúciós 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 elúciós 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 radioaktivitást tartalmazott és amiből 1.05×10^5 cpm-t nyertünk vissza a jelölt csúcsokban. (C) Reprezentatív elúciós profilja egy májmintának egy állatból, amely ugyanúgy volt kezelve, mint a (B) alatti, azzal a különbséggel, hogy leolés előtt 1 órával 1.2 mmol per kg FES-t kapott. Az injektált 100 μ l A oldat összesen 1.0×10^5 cpm radioaktivitást tartalmazott, amiből 9.20×10^4 cpm-t nyertünk vissza a jelölt csúcsokban. Kar: karnitin; Ac-Kar: acetilkarnitin; FES: fenilecetsav; FEAK: fenacetilkarnitin.

A kontroll állat radioaktív elúciós profilján (Fig. 1/B) az injektált 1.2×10^5 cpm radioaktivitásból a csúcsok alatti frakciók radioaktivitását összeadva 71,000, 29,000 és 5,000 cpm-et azonosítottunk mint szabad karnitint, acetil-karnitint valamint propionil-karnitint. (Bár a propionil-karnitin standard jelen kísérletben nem szerepel az A panelben, a kis csúcsot minden bizonnyal tekinthetjük propionil-karnitinnek, 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. 1/C), 33,900, 39,700 és 4,900 cpm aktivitásokat detektáltunk mint szabad karnitint, acetil-karnitint valamint propionil-karnitint. Ebben a mintában detektáltunk egy újabb 13,900 cpm aktivitású csúcsot, a többiekől jelentős távolságra, a FEAK retenciós idejének megfelelően. A mennyiségi számításokat elvégezve kitéjük, hogy a FES kezelt állatban 1 óra múlva az össz karnitin mintegy 15%-a volt FEAK formájában.

1. Ábra. A FEAK azonosítása HPLC-vel FES-val kezelt patkány májában



A FEAK leténc 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 2. Ábra.

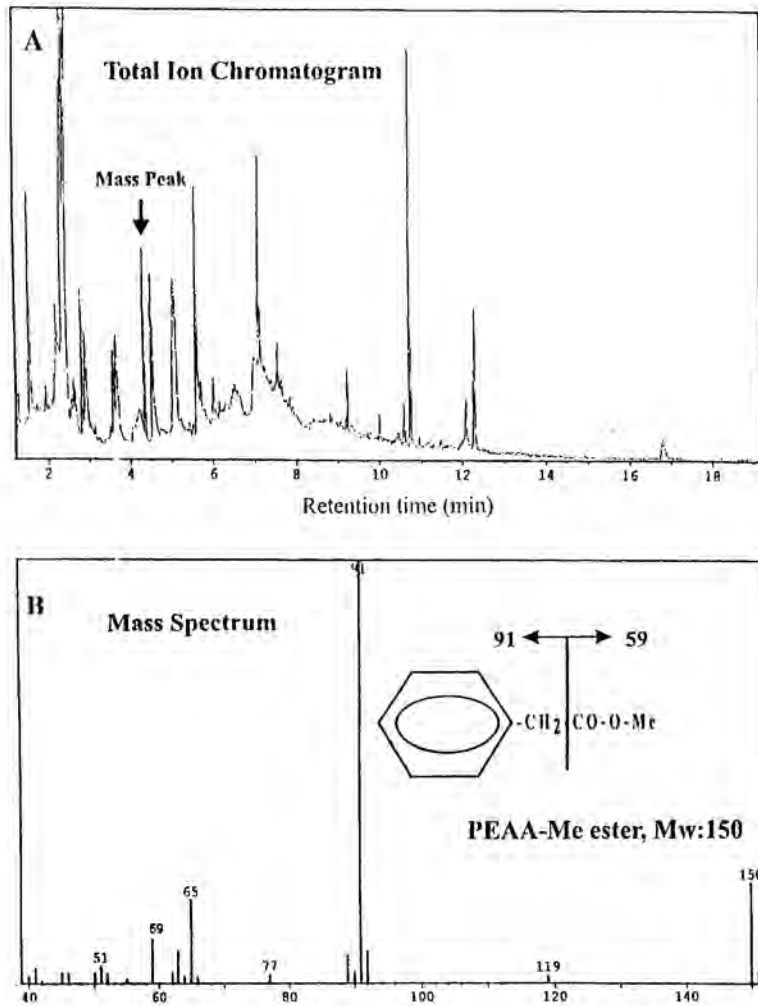
2. Ábra. A fenilecetsav elválasztása GC és detektálása MS segítségével.

2. 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 sáv, (vagy önmaga kation) kellett, hogy legyen. A részletes magyarázatot illetően a "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.

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 bizonyítéku, 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"?

Azt találtuk, hogy a karnitin szint emelésével a gyantás kezelésen átesett FES kritikus tömegszámai is jelentősen emelkedtek, tehát a FES karnitin észtert, azaz FEAK-ot képezett.

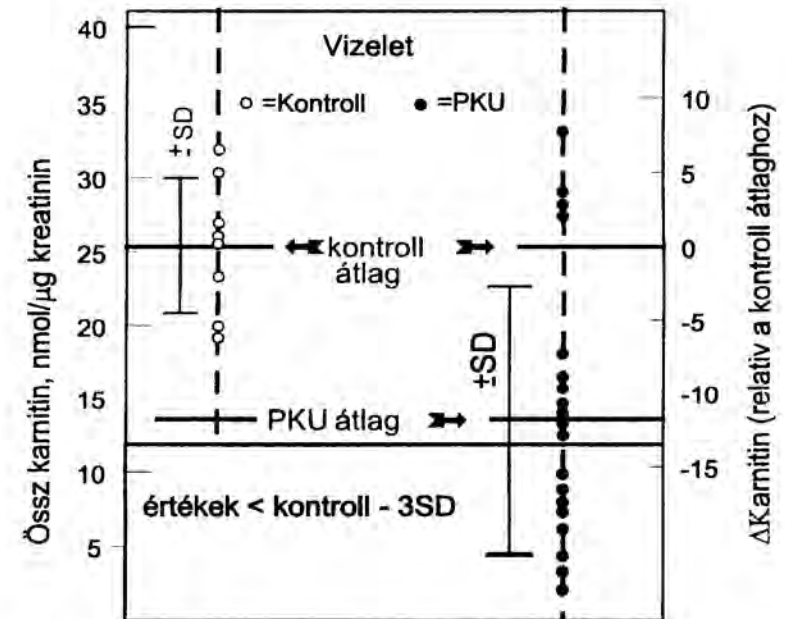
2. Ábra. A fenilacetsav elválasztása GC és detektálása MS segítségével.



1.4. Fenilketonuriában szenvedő betegek karnitin státusza

A "Módszerek", *Betegek* részében részletesen leírt beteganyag plazmájában megmértük a szabad és össz karnitint. A betegek plazmájában enyhe, de szignifikáns csökkenést találunk mind az össz, mind a szabad karnitint illetően. Ezen csökkenés lehetséges mechanizmusát megközelítendő (fokozott karnitin ürítés?) ugyanezen betegek vizeletében is meghatároztuk a karnitin tartalmat (3. Ábra).

3. 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 ábráztuk.

Mint az Ábrán látható (3. Ábra) a vizeletben történő karnitin meghatározásnál eredetileg nagyobbak az egyének közötti különbségek a kontrolloknál is, ezért az egyes betegeket adatait egyenként ábráztuk.

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. Megállapíthatjuk tehát, hogy a PKU betegek plazmájában a csökkent karnitin szintet nem egy fokozott ürítés okozza.

1.5. 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). Megállapítottuk, hogy a PKU betegek vizeletében jelen van a FEAk. Vizsgáltuk továbbá (patkánykísérlethez hasonlóan), hogy karnitin adására nő-e a kimutatható FEAk mennyisége. Azt találtuk, hogy a karnitin szuplementáció hatására (jelentősen emelkedett karnitin ürítés mellett) a FEAk mennyisége is megnőtt a betegek vizeletében.

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. Benzooesav analóg gyógyszerek hatása a karnitin bioszintézisre

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

Miután laboratóriumunk előzőleg kimutatta, hogy a benzooesav gátolja a karnitin bioszintézisét, jelen munkámban pedig prezentáltam a FES hasonló hatását, munkahipotézisünknek megfelelően a továbbiakban benzolgyűrűt tartalmazó gyógyszereket vizsgáltunk ilyen szempontból

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

Megállapítottuk, hogy a vizsgált gyógyszerek, acetil-szalicilsav, PAS, HVA, PAMBA, közül egyedül hatásosnak a PAMBA bizonyult, amelynek hatását a továbbiakban részletesen vizsgáltuk. A következőkben a PAMBA hatását terheléscsökkentő jelöléssel Bu karnitinné való átalakulásának mérésével is megerősítettük.

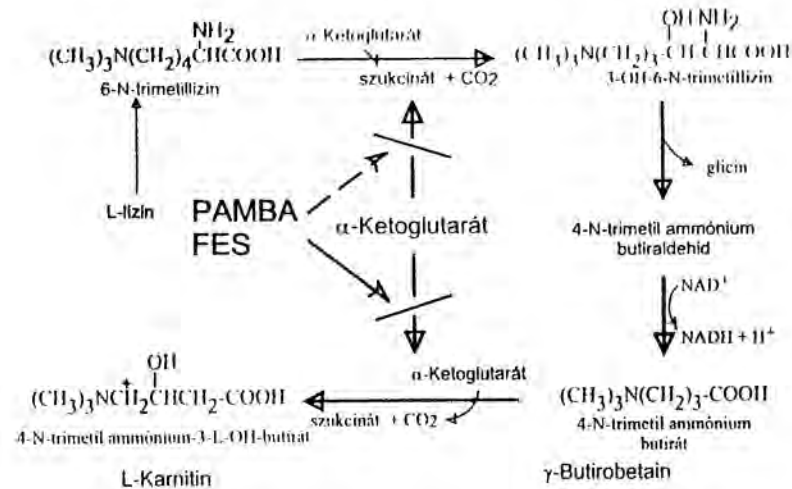
II.2. A PAMBA okozta karnitin szintézis gátlásmechanizmusa

Hasonlóképpen a FES esetéhez, itt is a Glu és az α -KG szint csökkenésére gondoltunk. Megállapítottuk, hogy mind a Glu mind az α -KG szint szignifikánsan csökkent a PAMBA hatására.

AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A disszertációmban leírt kísérletes munkák során megállapítottuk, hogy a Fenilecetsav, a káros fenilalanin lebontás során felhalmozódó egyik termék, és a para-amino-metil-Benzooesav (PAMBA) nevű hemosztatisz gyógyszer gátolja 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. Ábra.

4. Ábra. A Fenilecetsav és a PAMBA karnitin bioszintézisére kifejtett gátló hatása és annak mechanizmusa



Mint az ábrából látható, a bioszintézisben két α-KG függő hidroxilezési reakció, a trimetilizín hidroxiláz és a butirobetain hidroxiláz fordul elő. Kísérleteinkben mi csak az utóbbi, a Bu-hidroxiláz enzimén keresztül történő fluxust mértük, és annak jelentős esökkenését állapítottuk meg mindkét gátló ágens esetén, amit az α-KG szintjének esökkenése kísért. Az α-KG szintben történt változások hatékonyak lehetnek az enzimén keresztül történő *in vivo* fluxus esökkenésében, 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. 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 esökkenés a másik hidroxilező enzimén, a trimetilizín hidroxilázon keresztül történő fluxust is érinti, hozzájárulva ezáltal a Fenilecetsav és a PAMBA teljes *in vivo* gátló hatásának kifejtéséhez.

Arra a kérdésre, milyen mechanizmussal esökcentették nevezett ágensek az α-KG szintjét, a magyarázatot az egyidejűleg bekövetkező L-glutamát szint esökkenésben keressük, mivel az α-KG és a Glu egymásnak

partner szubsztrátjai a reversibilis glutamát dehidrogenáz és glutaminsav transzamináz reakciókban. Ezen szükségszerűen veti fel a következő kérdést: milyen mechanizmussal esökcent Glu szintje?

Korábbi munkánkban a Valproát esetében N-Valproil-glutamát képződését feltételeztük, vagy, irodalmi adatokra támaszkodva, a Glu fokozott decarboxilezését. A FES esetén ismert az N-fenacetil-glutamát képződése, de csak emberben(31). Viszont patkányban, ahol a Glu szint csökkenést mértük, ez a konjugáció nem történik meg, a mechanizmus pillanatnyilag ismeretlen. A kutatás jelen stádiumában ugyanezt mondhatjuk a PAMBA Glu szintre gyakorolt hatásáról is. A vizsgált benzooesav analóg gyógyszerek, továbbá a fenilecetsav és a benzooesav szerkezetét összevetve úgy tűnik, hogy egy hidroxil csoport bevitele a karboxil csoport mellé felfüggeszti a karnitin bioszintézisre gyakorolt gátló hatást.

A Fenilecetsav karnitin szintézist gátló hatása jól összeeseng egy nemrégiben megjelent közleménnyel, amely szerint az emberi terápiában is alkalmazott benzooesav 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 (1. Ábra) és GC-MS technikával (2. Ábra) bizonyítottunk mind patkányban, mind emberben. A benzoilkarnitin 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 esökcent plazma karnitin koncentrációk mellett a vizelettel való karnitin ürítés (a betegek többségében) drasztikusan esökcent. A két jelenség együtt egy esökcentett sebességű karnitin bioszintézissel magyarázható, amikor a vese az ürítés esökcentésével próbálja az elégtelen szintézist kompenzálni a plazma és szöveti karnitin szintek fenntartása végett.

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

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

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., Debreceni B., Farkas V., Sándor A.)
XXV. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 1995

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

1998

G. Fischer, V. Farkas, B. Debreceni and A. Sándor "THE EFFECT OF CATABOLIC PRODUCTS OF PHENYLALANINE METABOLISM ON CARNITINE BIOSYNTHESIS" 30th Conference of Hungarian-American Medical Assitiation, 1998, Sarasota (Florida).

The effect of catabolic products of phenylalanine metabolism on carnitine metabolism in patients with PKU. (Fischer G., Debreceni 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

Lipóamid hatása a reaktív oxigén speciek mediálta 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, *Free Radical Biol. Med.* 1999, **27**, 1103-1113.

Gabriella Skuta, Gabor M. Fisher, 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**, 1915-1925.

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 *Biochim*
Biophys Acta 1501, 2000, 200-210

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