

Karnitinészter profil és genotípus vizsgálatok karnitinhiányos állapotokban

PhD értekezés

Berenténé Bene Judit

Orvosi Genetikai és Gyermekejlődéstani Intézet
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Témavezető: Dr. Melegh Béla

**2008.
Pécs**

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	3
1. BEVEZETÉS	4
2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	5
2.1. A karnitin szerepe emberben	5
2.1.1. <i>A karnitin szerepe az anyagcsere folyamatokban</i>	6
2.1.2. <i>A karnitin egyéb funkciói</i>	7
2.1.3. <i>A szervezet karnitin homeosztázisa</i>	8
2.2. A karnitin bioszintézise emberben	11
2.3. Karnitinhányos állapotok	13
2.3.1. <i>Primer karnitinhányos állapotok</i>	14
2.3.1.1. <i>Primer szisztémás karnitin deficiencia</i>	14
2.3.1.2. <i>Primer miopátiás karnitin deficiencia</i>	17
2.3.2. <i>Szekunder karnitinhányos állapotok</i>	17
2.4. Gasztroenterológiai betegségek	19
2.4.1. <i>Coeliakia</i>	19
2.4.2. Gyulladásos bélbetegségek	20
2.4.2.1. <i>Crohn betegség</i>	21
2.4.2.2. <i>Colitis ulcerosa</i>	23
3. CÉLKITŰZÉSEK	25
4. MÓDSZEREK	26
4.1. A vizsgálatban résztvevő betegek	26
4.2. Alkalmazott analitikai módszerek	32
4.2.1. <i>A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata vizeletben HPLC-ESI tandem tömegspektrometria alkalmazásával</i>	32
4.2.2. <i>A plazma és szérum karnitínészter profiljának vizsgálata ESI triple quadrupol tandem tömegspektrometriával</i>	35
4.3. Molekuláris genetikai módszerek	37
4.3.1. <i>A mitokondriális ATPase6 gén mutáció vizsgálata direkt szekvenálással</i>	37
4.3.2. <i>Az SLC22A5 mutációk vizsgálata RFLP analízissel és direkt szekvenálással</i>	38
4.3.3. <i>A CARD15 gén mutációinak vizsgálata direkt szekvenálással</i>	40

4.3.4. Az SLC22A4 és SLC22A5 gén polimorfizmusok vizsgálata direkt szekvenálással	41
4.4. Statisztikai módszerek	42
5. EREDMÉNYEK	43
5.1. A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata	43
5.2. Primer karnitinhiányos betegek molekuláris genetikai vizsgálata	45
5.3. Leigh szindrómás beteg mitokondriális DNS-ének genetikai vizsgálata és szérum karnitínészter profiljának meghatározása	46
5.4. Karnitínészter profil vizsgálata coeliakiás betegekben	47
5.5. A Crohn betegségre hajlamosító CARD15 gén, valamint a karnitin transzporter gének (SLC22A4, SLC22A5) polimorfizmusainak vizsgálata ..	48
5.5.1. Gyermek Crohnos betegekben	48
5.5.2. Felnőtt Crohnos betegekben	50
5.6. Karnitínészter profil és a karnitin transzporter gének SNP genotípusának vizsgálata felnőtt Crohn betegekben	51
5.7. Karnitínészter profil vizsgálata colitis ulcerosás betegekben	54
6. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	56
6.1. A karnitin bioszintézisének vizsgálata	56
6.2. Primer karnitinhiányos betegek molekuláris genetikai vizsgálata	57
6.3. Leigh szindrómás beteg mitokondriális DNS-ének genetikai vizsgálata és szérum karnitínészter profiljának meghatározása	58
6.4. A karnitínészter profil vizsgálata coeliakiás betegekben	58
6.5. A Crohn betegségre hajlamosító CARD15 gén, valamint a karnitin transzporter gének (SLC22A4, SLC22A5) polimorfizmusainak vizsgálata gyermek és felnőtt betegpopulációban	61
6.6. Karnitínészter profil és a karnitin transzporter gének SNP genotípusának vizsgálata felnőtt Crohn betegekben	63
6.7. A karnitínészter profil vizsgálata colitis ulcerosaban	64
7. KÖVETKEZTETÉSEK	67
8. IRODALOMJEGYZÉK	68
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	88

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

TML	ϵ -N-trimetillizin
HTML	β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin
TMABA	γ -trimetilamino-butiraldehid
TMLD	ϵ -N-trimetillizin-hidroxiláz
HTMLA	β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin-aldoláz
TMABA-DH	γ -trimetilamino-butiraldehid-dehidrogenáz
BBD	γ -butirobetain-hidroxiláz
OCTN1	organikus kation transzporter 1
OCTN2	organikus kation transzporter 2
SLC22A4	solute carrier 22 fehérje család 4. tagja
SLC22A5	solute carrier 22 fehérje család 5. tagja
ESI/MS/MS	elektrospray tandem tömegspektrometria
IBD	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
CD	Crohn betegség
CU	colitis ulcerosa (fekélyes bélgyulladás)
AC	acilkarnitin
FC	szabad karnitin (free carnitine)
PCR	polimeráz láncreakció
RFLP	restrikciós hossz polimorfizmus meghatározás
SNP	single nucleotide polymorphism
CARD15	Caspase recruitment domain-containing protein 15
SCFA	rövid szénláncú zsírsav

1. BEVEZETÉS

A karnitin molekula elsődlegesen a zsírsavak lebontásában és ezen keresztül az energiatermelésben játszik nélkülözhetetlen szerepet. A karnitin homeosztázisát három fő tényező tartja fent: az endogén szintézis, a táplálékkal való felvétel és a vesék tubulusaiban zajló visszaszívás. Az irodalomban található adatok alapján felmerül a kérdés, hogy ha korlátlanul zajlik a bioszintézis, akkor hogyan alakul ki karnitinhiányos állapot emberben? Munkánk első részeként érett újszülöttekben vizsgáltuk a karnitin bioszintézis útvonalát az egészségre ártalmatlan, [²H₉]-jelölt TML terheléssel.

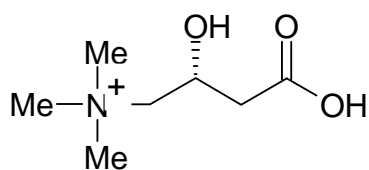
A táplálék eredetű karnitin felszívódása elsősorban a vékonybélben történik aktív transzporttal. A transzport folyamat egy nagy affinitású, Na⁺ függő transzporterrel, az OCTN2-n keresztül zajlik. Az irodalomból már régóta ismeretes, hogy a humán OCTN2 transzporter génjében bekövetkező változások primer karnitinhiányos állapotok kialakulásához vezetnek. Munkánk másik részeként olyan magyar családok molekuláris genetikai vizsgálatát végeztük el, melyek klinikailag a primer karnitinhiányos állapot jellegzetességeit mutatták.

Laboratóriumunkban az elmúlt öt évben bevezettünk egy nagy érzékenységgű analitikai eljárást, a tandem tömegspektrometriát, mely lehetővé teszi a korábbi radioenzimatikus karnitinmérésekkel szemben az egyes karnitínészterek egyedi, minőségi és mennyiségi meghatározását. Ezt az eljárást alkalmazva három olyan gasztroenterológiai betegségben, melyek klinikai tünettanát tekintve emlékeztetnek a szekunder karnitinhiányos állapotokra, elvégeztük a karnitínészterek profilszerű vizsgálatát.

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

2.1. A karnitin szerepe emberben

A karnitin triviális neve a latin *caro* (hús) szóból ered, kémiai elnevezése: β -hidroxi- γ -N-trimetilaminovajsav (1. ábra), egy rendkívül fontos metabolit, mely majdnem minden állatfajban, számos mikroorganizmusban és növényben is megtalálható.



1. ábra Az L-karnitin szerkezete

Emlősökben a karnitin összes ismert funkciója a karnitin molekula 3-as helyzetben lévő hidroxil csoportjának reverzibilis észterezését, majd a keletkezett acilkarnitinek sejtkompartmentek közötti transzlokációját foglalja magába. Az acilkarnitinek képződését katalizáló enzimek a karnitin aciltranszferázok (1. táblázat) széles és átfedő szénlánc hosszúság specificitással, különböző celluláris lokalizációval és metabolikus funkcióval (pl. mitokondriális és peroxisomális zsírsavoxidáció, celluláris KoASH homeosztázis) rendelkeznek (Brehmer, 1983; Bieber, 1988; Ramsay et al., 2001).

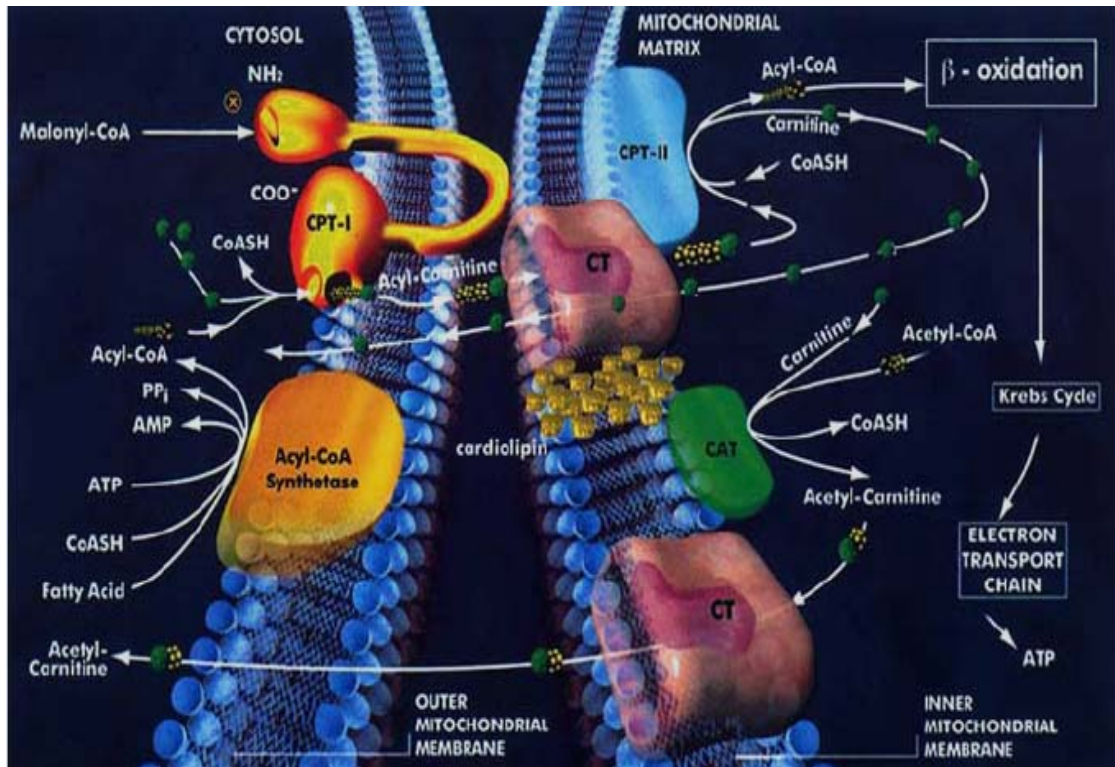
1. táblázat Karnitin aciltranszferázok és sejten belüli elhelyezkedésük

Enzim csoport	Szubsztrát	Lokalizáció
Karnitin acetiltranszferáz	Rövid szénláncú acil csoportok (C1-C4)	Mitokondrium Peroxiszómák Mikroszómák
Karnitin oktanoiltranszferáz	Közepes szénláncú acil csoportok (C5-C12)	Peroxiszómák, Mikroszómák
Karnitin palmitoiltranszferáz	Hosszú szénláncú acil csoportok (>C12)	Mitokondrium

2.1.1. A karnitin szerepe az anyagcsere folyamatokban

A karnitin elsődleges fiziológiai szerepe az aktivált hosszú szénláncú zsírsavak szállítása a citoszolból a mitokondriumba, ahol β -oxidációs folyamatban lebomlanak (McGarry et al., 1997; Ramsay et al., 2001). A hosszú szénláncú zsírsavak ugyanis sem magukban, sem pedig koenzim A-val tioészterezett formában nem képesek átjutni a belső mitokondriális membránon, a transzport karnitínészter formában történik (2. ábra).

Az exogén és endogén eredetű zsírsavak a sejtekben egyaránt a koenzim A (KoA) molekulával képzett tioészterek formájában (acil-KoA), aktivált állapotban vannak jelen. A citoszolban a hosszú szénláncú zsírsavak KoA észterei az L-karnitinnel acil-karnitin észterre átésztereződnek, ezt a folyamatot a külső mitokondriális membrán külső felén elhelyezkedő, malonil-KoA szenzitív, karnitin palmitoil-transzferáz I (CPT I) enzim katalizálja. A reakció során a hosszú szénláncú zsírsav acil része a KoA molekuláról a karnitin hidroxil csoportjára kerül át. A keletkező hosszú szénláncú acil-karnitin észterek a mitokondriális membránon keresztül egy specifikus szállító, a karnitin-acilkarnitin transzlokáz (CT vagy CACT) segítségével transzportálódnak. A mitokondriális mátrixba bejutva a belső mitokondriális membrán mátrix oldalán elhelyezkedő karnitin-palmitoiltranszferáz II (CPT II) enzim segítségével visszaalakulnak acil-KoA-vá. A felszabadult karnitin a CT-n keresztül elhagyhatja a mitokondriumot, hogy egy újabb transzportban vegyen részt. A mitokondriális mátrixban a karnitin acetiltranszferáz (CAT) enzim képes a rövid és közepes szénláncú acil-KoA molekulákat acilkarnitinné visszaalakítani a mitokondriumban lévő karnitint használva. Ezek az acilkarnitinek aztán a CT-n keresztül elhagyhatják a mitokondriumot. Ezen a reverzibilis acilálási mechanizmuson keresztül a karnitin szabályozni tudja a szabad KoA és az acil-KoA intracelluláris koncentrációit.



2. ábra A karnitin szerepe a hosszú szénláncú zsírsavak mitokondriumba történő szállításában (Evangelidou et al., 2003)

A karnitin másik kiemelkedő szerepe a peroxiszómális β -oxidációs folyamat termékeinek, mint pl. az acetyl-KoA-nak a peroxiszómákból a mitokondriumba történő szállítása, ahol teljes lebomlásuk során a Krebs ciklusban CO_2 és H_2O keletkezik (Jakobs et al., 1995; Verhoeven et al., 1998). A nagyon hosszú szénláncú zsírsavak ($>\text{C}_{22}$) és egyes elágazó szénláncú zsírsavak részleges lebontása ugyanis a peroxiszómákban történik.

2.1.2. A karnitin egyéb funkciói

A klasszikus élettani szerepén túl a karnitin számos egyéb feladatot lát el a szervezetben. Ezen funkciók közé tartozik az acil-KoA/KoA arány modulálása (McGarry et al., 1997; Carter et al., 1995), mely arány szabályozza számos, többek között a citrátkörben, a glukoneogenezisben, a karbamid ciklusban és a zsírsavoxidációban részt vevő mitokondriális enzim aktivitását (Evangelidou et al., 2003). Részt vesz az energia tárolásában acetyl-karnitin formában (Bremer, 1983; Carter et al., 1995), modulálja a részlegesen metabolizált acil csoportok toxikus hatásait azáltal, hogy karnitinszter formájában kiürülnek (Duran et al., 1990).

Továbbá szerepet játszik a triacilglicerin újraészterezésében az endoplazmás retikulumban mielőtt VLDL lipoprotein formában kiválasztódik, a piruvát és az elágazó szénláncú aminosavak oxidatív metabolizmusának stimulálásában, az eritrocita membrán foszfolipidek átalakításához szükséges dezacilezési és reacilezési folyamatokban, neuronokban a zsírsavaknak a foszfolipidek és trigliceridek közötti átvitelében, többszörösen telítetlen zsírsavak szintézisében és lánchosszabbításában, fehérjék és membránok stabilizálásában (Reda et al., 2003).

2.1.3. A szervezet karnitin homeosztázisa

A karnitin lehet táplálék eredetű (a szervezet teljes karnitin készletének kb. 75 %-a) vagy endogén bioszintézis terméke. Az emberi szervezetben karnitin elsősorban a májban és a vesében, valamint az agyban szintetizálódik a lizin és metionin esszenciális aminosavakból. Emlősökben a fehérjéhez kötött trimetillizin a karnitin prekursora. Az étrendi karnitin elsődlegesen állati eredetű termékekben (hús, szárnyasok, halak, tejtermékek) található, azonban kisebb mennyiség előfordul a gabonafélékben, gyümölcsökben, zöldségekben is (2. táblázat).

Más szigorúan szabályozott tápanyagokkal (pl. kalcium, vas, nátrium, kálium) ellentétben a táplálkozással felvett karnitin korrelál a plazma karnitin koncentrációjával ($r=0,64$, $<0,05$) egészséges felnőttekben (Lennon et al., 1986). Kevesebb állati fehérjét fogyasztók pl. vegetáriánusok (Lombard et al., 1989; Cederblad, 1987), vagy elsősorban gabona alapú étrenden élő emberekben alacsonyabb a plazma karnitin koncentrációja, mint az állati eredetű fehérjét is tartalmazó étrenden élő emberekben. Az étrend zsír és szénhidrát tartalma is befolyásolja a karnitin státuszt. A magas zsír és alacsony szénhidrát tartalmú diétán tartott egyéneknek a diéta 6-dik napjára szignifikánsan nagyobb lesz a plazma szabad és összkarnitin koncentrációja és nagyobb az össz-, szabad és acilkarnitinek vizelettel történő kiválasztása, mint az alacsony zsír és magas szénhidrát diétán lévőké (Cederblad, 1987; Cederblad et al., 1972).

Az emberi test karnitin homeosztázisában a vese döntő szerepet játszik, mivel a glomerulus filtrátumokból történő renális tubuláris reabszorpció során visszatartja a szervezet karnitin tartalékát.

2. táblázat Radioenzimatikus módon vizsgált táplálékok karnitin tartalma (Steiber et al., 2004)

Táplálékfeleség	Összkarnitin/100 g étel (μmol)	Referencia
<i>Állati eredetű termékek</i>		
nyers marhahús	3691,4-4160,5	Erfle és mtsai (1970)
elkészített darált marhahús	300	Rudman és mtsai (1977)
nyers marhamáj	160,4	Erfle és mtsai (1970)
elkészített csirke	60	Rudman és mtsai (1977)
elkészített tyúktojás	5	Rudman és mtsai (1977)
<i>Gabonafélék</i>		
kukoricapehely	59	Rudman és mtsai (1977)
búzadara	51	Rudman és mtsai (1977)
rizs	44	Rudman és mtsai (1977)
kenyér	10,9	Rudman és mtsai (1977)
búzacsíra	7,41	Panter és Mudd (1969)
búza mag	2,47	Panter és Mudd (1969)
zab mag	0,62	Panter és Mudd (1969)
árpa mag	0	Panter és Mudd (1969)
<i>Gyümölcsök</i>		
almakompót	19,5	Rudman és mtsai (1977)
körte	17	Rudman és mtsai (1977)
narancslé	11	Rudman és mtsai (1977)
őszibarack	10	Rudman és mtsai (1977)
almalé	8	Rudman és mtsai (1977)
ananasz	6,5	Rudman és mtsai (1977)
<i>Zöldségek</i>		
paradicsom	18	Rudman és mtsai (1977)
karfiol	8,64	Panter és Mudd (1969)
borsó	7,2	Rudman és mtsai (1977)
zöldbab	5	Rudman és mtsai (1977)
spenót levél, káposzta levél, sárgarépa, krumpli	0	Rudman és mtsai (1977) és Panter és Mudd (1969)
<i>Tejtermékek</i>		
tehéntej (μmol/100 g)	16,4	Rudman és mtsai (1977)
tehéntej (μmol/100 ml)	259,8	Ferreira (2003)
anyatej	50,0	Ferreira (2003)

A szervezet teljes karnitin állománya meglehetősen dinamikus, a karnitin és az acilkarnitinek vándorolnak a gasztrointesztinális traktus (abszorpció után), a máj (bioszintézis után), a vese (kiválasztódás céljából) és a karnitin dependens szövetek, mint pl. a szív vagy a vázizmok között. Metabolikus változást követően a szöveten belül a karnitin állomány ismét megoszlik a karnitin és az acilkarnitinek között. Mivel a karnitin és az acilkarnitinek nem képesek közvetlenül átjutni a plazmamembránokon és a karnitin szövetekből történő ki- és bejutása szövetspecifikus transzport rendszerek segítségével történik (Kerner et al., 1998), ennek következménye, hogy a szövetek összkarnitin tartalma és a karnitin homeosztázisának kinetikája rendkívüli mértékben különbözik egymástól. Drámai változások mehetnek úgy végbe egyes

biológiai kompartmentek karnitin homeosztázisában, hogy az nem tükröződik más egységekben.

A plazma a karnitinnek és az acilkarnitineknek csak a szövetek közötti szállítását szolgálja és mint ilyen, ezek koncentrációi relatíve alacsonyak. Egészséges felnőttben a plazma szabad L-karnitin szintje 40-50 $\mu\text{mol/l}$, az acetil-karnitiné (a legnagyobb mennyiségben előforduló észteré) tipikusan 3-6 $\mu\text{mol/l}$. Az össz L-karnitin koncentrációja kb. 50-60 $\mu\text{mol/l}$ (Evans et al., 2003). Mivel a karnitinnek nincs ismert metabolikus funkciója a plazmában, így a plazma karnitin koncentrációjának változásai csak egyéb, metabolikus vagy szövetspecifikus információ összefüggésében értelmezhetők. A vese, a máj és a vázizom a plazmabeli koncentrációnál jóval nagyobb koncentrációban tartalmaz karnitint (3. táblázat). A vázizomzat nagy mennyiségének köszönhetően a szervezet teljes karnitin mennyiségének többsége a vázizom egységekben van jelen, nagyon kevés van a plazmában vagy az extracelluláris egységekben.

3. táblázat A humán szervezet különböző szöveteinek és szerveinek karnitin tartalma (Evans et al., 2003)

Kompartment	Koncentráció ($\mu\text{mol/l}$ vagy $\mu\text{mol/kg}$)	Becsült tartalom (mmol)	Becsült tartalom (a felsorolt egységek %- os eloszlása)
Plazma és extracelluláris folyadék	40-50	0,5	~0,4
Máj	500-1000	1,3	~1
Vese	330-600	0,2	~0,2
Vázizom	4000-ig	126,4	>98
Az összes felsorolt egység		128,4	

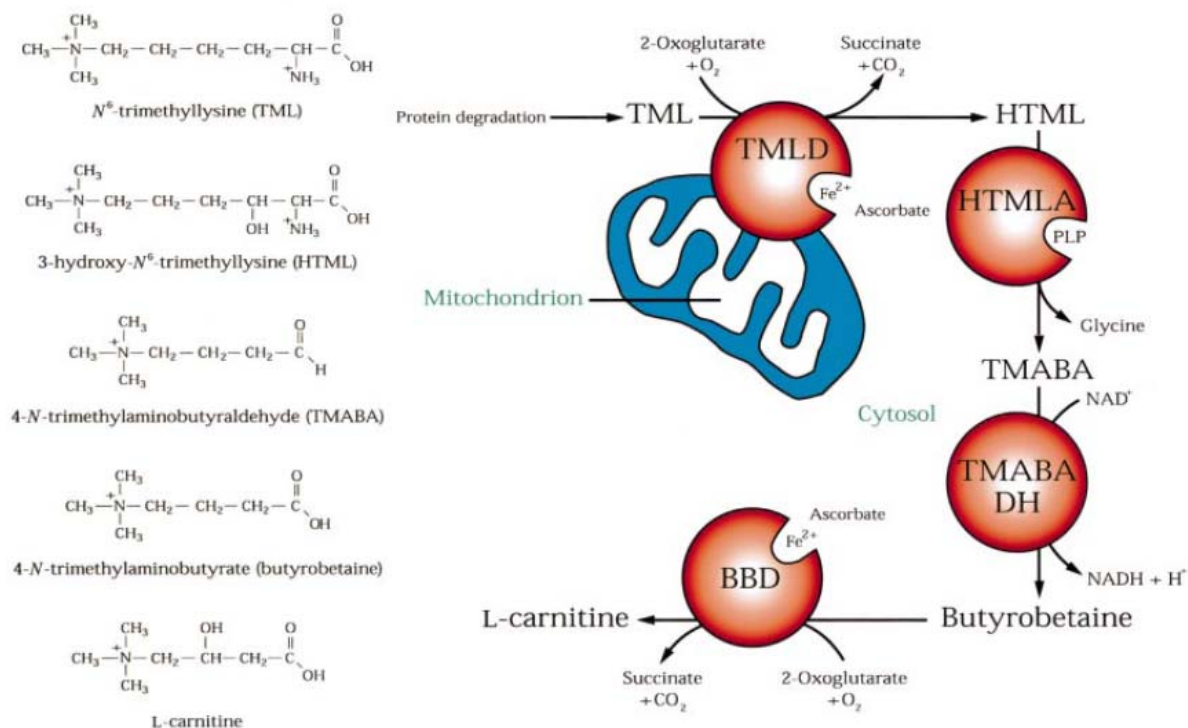
Habár a karnitin mennyiségének 99 %-a intracelluláris, a kapcsolat a szérum acilkarnitinek (AC) és a szabad karnitin (FC) között nagyon érzékeny a mitokondriumon belüli anyagcsere változásokra. Ilyen változások bekövetkezhetnek normál és rendellenes körülmények között is. Ilyen normál szituáció lehet, ami az AC és FC közötti kapcsolat változásával jár, az éhezés, ahol az emelkedett ketogenezis a plazma szabad karnitinjének csökkenéséhez és az acetilkarnitinek megfelelő növekedéséhez vezet (Border et al., 1970). Egyéb normál körülmény lehet az öregedés és a terhesség (Arockia-Rani et al., 2001; Marzo et al., 1994). Rendellenes AC/FC arányt mutató patológiás szituáció pl. számos veleszületett anyagcsere

betegség, főképpen a szerves aciduriák (Stumpf et al., 1985) a cirrózis (Amodio et al., 1990), a krónikus veseelégtelenség (Reddi et al., 1998) és olyan orvosi beavatkozások, mint pl. valproát (Riva et al., 1993; Melegh et al., 1990) vagy zidovudin (Dalakas et al., 1994) kezelés. Az AC/FC arány rendellenessége figyelhető meg továbbá pl. a diabetes összes típusában (Cederblad et al., 1982; Tamamogullari et al., 1999), a szívelégtelenségben (Atar et al., 1997) és az Alzheimer betegségben (Rubio et al., 1998).

Normál körülmények között a szérum karnitin kb. 80 %-a szabad karnitin formában van és a normál AC/FC arány 0,25, a 0,4-nél magasabb AC/FC arány rendellenesnek tekintendő.

2.2. A karnitin bioszintézise emberben

A karnitin egy olyan létfontosságú vegyület, melyről ma azt gondolják, hogy emberben történik ugyan bizonyos mértékű szintézis, azonban a humán szervezet mégis külső karnitin bevitelre szorul vagy szorulhat bizonyos körülmények között (Rebouche et al., 1998; Vaz et al., 2002b). Az emlős karnitin bioszintézis modelljei a patkány szövetei voltak (3. ábra).



3. ábra A karnitin bioszintézis útvonala és metabolitjainak kémiai szerkezete (Vaz et al., 2002b)

A klasszikus elképzelések szerint emlősökben a karnitin bioszintézise öt enzimatikus reakciót magába foglaló többlépcsős folyamat. Ez a reakciósorozat a lizoszómákban kezdődik, ahol a lizin, ami a karnitin szénvázát szolgálja, valamilyen fehérjeláncban (elsősorban harántcsíkolt izomban) kötött formában ϵ -pozíciójú aminos csoportján trimetiléződik, s fehérjéhez kötött ϵ -N-trimetillizin (TML) képződik. A reakciót nukleáris enzimek (fehérje-lizin metiltranszferázok) katalizálják és az S-adenozilmetionint használják fel metil donorként. A fehérjéhez kötött TML, ami a karnitin bioszintézis első metabolitja, a fehérjék lizoszomális hidrolízise során felszabadul. A szabad TML egy intramitokondriális enzim, a TML-hidroxiláz (TMLD; EC 1.14.11.8) hatására molekuláris oxigén fogyasztása mellett β -pozíciójú szénatomján hidroxileződik a mitokondriális mátrixban β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizint (HTML) eredményezve. Ez az enzimatikus folyamat, mely a vesében, a májban, a szívben, az izomban és az agyban is végbemegy, 2-oxoglutarátot és Fe^{2+} -t igényel kofaktorként. A TML-hidroxiláz enzimatikus aktivitásához C-vitamin jelenlétére is szükség van, feltételezhetően a vas Fe^{2+} állapotban tartása céljából (Hulse et al., 1978; Sachan et al., 1980; Davis et al., 1984). A reakció során keletkező metabolit aztán ismét a citoszolba kerül és a sejtmembránon keresztül a keringésbe jut.

A keringésből ismét szöveti transzporttal a citoszolba kerül, majd a β -hidroxi- ϵ -N-trimetillizin aldoláz (HTMLA; EC 4.1.2.'X') hatására a metabolitból egy glicin hasad le γ -trimetilamino-butiraldehidet (TMABA) eredményezve (Kaufman et al., 1977; Hulse et al., 1978). A HTMLA, mint a legtöbb aldoláz, a piridoxál 5'-foszfátot, a piridoxin (B_6 vitamin) származékát használja kofaktorként. A TMABA-t a γ -trimetilamino-butiraldehid-dehidrogenáz (TMABA-DH; EC 1.2.1.47) NAD^+ segítségével γ -butirotetainná alakítja (Hulse et al., 1980). Humán szövetekben a TMABA dehidrogéneződési sebessége a májban a legnagyobb, jelentős még a vesében is, azonban alacsony az agyban, a szívben és az izomban (Rebouche et al., 1980). A keringésbe bekerült γ -butirotetaint elsősorban a vese és a máj veszi fel aktív transzporttal. A karnitin bioszintézis utolsó reakciólépésében a vese vagy a máj citoszoljában a γ -butirotetain a γ -butirotetain hidroxiláz (BBD; EC 1.14.11.1) hatására molekuláris oxigén fogyasztása mellett karnitinné hidroxileződik. (Bremer, 1983; Lindstedt et al., 1970; Englard, 1979). Ez az enzimatikus folyamat 2-oxoglutarátot, Fe^{2+} -t és C vitamint igényel kofaktorként. Emberben a γ -butirotetain hidroxiláz aktivitása lényegesen (3-16-szor) nagyobb a vesében, mint a májban, míg

az agyban az aktivitás a májban lévő aktivitásnak az 50 %-a. Kísérletes adatok azt mutatják, hogy ez az utolsó lépés valóban zajlik emberben is. A butirobetain irreverzibilis reakcióban alakul át karnitinné; bizonyított az is, hogy az exogén eredetű butirobetain is közel sztöchiometrikus mennyiségben karnitinné alakul a humán szervezetben (Rebouche et al., 1989; Vaz et al., 2002b).

Emberben a karnitin bioszintézis sebességét a TML mitokondriumon belüli hozzáférhetősége határozza meg (Rebouche, 1986). A TML szabályozó hatását Rebouche és mtsai mutatták ki, TML-t adva feleslegben a humán szervezetben 8-szoros növekedés következett be a karnitin bioszintézisében. Az exogén és endogén eredetű TML 30-50 %-a alakul át karnitinné, a maradék a vizelettel kiürül (Rebouche et al., 1989). Az emberek kb. 1-2 μmol karnitint szintetizálnak naponta testsúlykilogrammonként (Sahajwalla et al., 1995).

2.3. Karnitinhiányos állapotok

A karnitinhiányos állapotok változó klinikai tünetekkel járó heterogén betegségecsoport. Mivel a karnitin a zsírsavak oxidációja mellett az intracelluláris szabad és acil-KoA homeosztázisában is fontos szerepet játszik, így nem meglepő, hogy a karnitin deficiencia klinikai megjelenése igen változatos. Karnitinhiányról akkor beszélünk, amikor a plazmában vagy a szövetekben a karnitin koncentráció alacsonyabb a szervezet normális funkcióinak az igényénél. A klinikai gyakorlatban a plazma szinteket gyakran használják a karnitin deficiencia diagnosztizálására, bár ezen értékek nem mindig tükrözik a szöveti karnitin koncentrációkat. A karnitin szükséglet számos tényezőtől függ, mint például az életkor, diéta, a szövetek β -oxidációtól való függése és az anyagcsere állapot (pl. stressz, táplált/éhező, nyugalmi/izommunka közbeni) (Rebouche, 1992). A klinikai és biokémiai adatok alapján azt mondhatjuk, hogy a szöveti karnitin szintek a normál érték 10 % - 20 %-a alá esnek, mielőtt a biológiai hatások klinikailag szignifikánssá válnának (Stanley, 1987).

A karnitinhiány eredetét tekintve lehet primer vagy szekunder.

2.3.1. Primer karnitinhoányos állapotok

A primer karnitin deficienciák veleszületett rendellenességek, amelyek a karnitin homeosztázis valamelyik komponensét érintik. A primer karnitin deficiencián belül az alacsony karnitintartalom szöveti eloszlásától függően megkülönböztetünk szisztémás és miopátiás formát. A szisztémás formában a karnitin koncentráció alacsony mind az érintett szövetekben (szív, vázizom, máj), mind a vérplazmában, míg a miopátiás formában az alacsony karnitintartalom csak az izmokra korlátozódik. Ezt az osztályozást a témával foglalkozó szakmai közösség folyamatosan újraértékeli és ennek során a miopátiás forma, mint önálló entitás létjogosultságát egyre inkább vitatják. Mindazonáltal a jelen dolgozatban még ezen felosztás alapján tárgyaljuk az eddig felhalmozódott ismereteket.

2.3.1.1. Primer szisztémás karnitin deficiencia

A primer szisztémás karnitin deficienciát (OMIM 212140), ami egy autoszomális recesszív módon öröklődő betegség, először Karpati és mtsai írták le 1975-ben (Karpati et al., 1975). A betegség előfordulási gyakorisága japán újszülöttekben 1:40 000 (Koizumi et al., 1999), és 1:37 000 és 1:100 000 között van Ausztráliában (Wilcken et al., 2001). Sem Európára (beleértve hazánkat is), sem Amerikára vonatkozóan nincsenek pontos adatok, azonban az irodalomban leírt esetek alapján feltételezhető, hogy az előfordulás gyakorisága hasonló a japán adatokhoz (Longo et al., 2006). A klinikai tünetek kezdete 1 hónapos kortól 7 éves korig terjedhet. Három különböző megjelenési formát írtak le: progresszív kardiomiopátia, miopátia és hipoketotikus hipoglikémiás encephalopátia. Az összes megjelenési forma egyidejűleg jelen lehet ugyanabban a családban (Stanley et al., 1991; Tein et al., 1990; Garavaglia et al., 1991). A progresszív kardiomiopátia a leggyakoribb, és rendszerint idősebb embereken fordul elő. A miopátia, ami hipotóniában vagy lassan súlyosbodó proximális gyengeségben manifesztálódik, gyakran társul kardiomiopátiával vagy encephalopathiával. Hipoketotikus hipoglikémiával társuló akut encephalopathia gyakrabban fordul elő csecsemőkben (Pons et al., 1995). Rendszerint ezeket az akut epizódokat hányással vagy étvágytalansággal járó vírusos megbetegedések váltják ki. A primer karnitin deficiencia miopátiás formájával szemben a szisztémás karnitin deficiencia alacsony plazma karnitin koncentrációkkal

jellemezhető (Kerner et al., 1998). A dikarbonsav aciduria hiánya arra utal, hogy nincs primer β -oxidációs enzim defektus (Tein et al., 1990).

A primer szisztémás karnitinhiányos állapot elvi lehetséges okai a következők: lecsökkent bioszintézis, felgyorsult lebontás és károsodott transzport, mely a karnitin szövetekből történő felvételét és leadását érinti. A szisztémás karnitin deficienciában szenvedő betegek között ezidáig nem találtak bizonyítékot lecsökkent bioszintézisre vagy túlzott mértékű lebontásra (DeVivo et al., 1990). A betegség molekuláris háttere az organikus kation transzporter, az SLC22A5 génről leírt fehérje, az OCTN2 genetikai defektusa miatt fellépő karnitin vesztés a vizeletben. A genetikailag determináltan károsodott vagy hiányzó transzporter nem képes a keringésből a karnitint felvenni. Ezzel párhuzamos következmény, hogy a vese is elveszti a karnitin visszaszívó képességét, aminek következménye az, hogy a keringő karnitin mennyisége is drámaian lecsökken.

A nagy affinitású humán organikus kation transzportert (OCTN2) kódoló gén (SLC22A5) DNS szekvenciáját már a humán genom feltárásának keretében megismerték, azonban szerepét a karnitin felvételében csak 1998-ban bizonyították. A 10 exonból álló gén megközelítőleg 30 kb nagyságú és az 5q31.1-32 kromoszóma régióban található (Tamai et al., 1998; Wu et al., 1998). Az OCTN2 fehérje nagyfokú homológiát (75,8 %) mutat az SLC22A4 gén által kódolt, az organikus kationtranszporter család egyik korábban megismert tagjával, az OCTN1 fehérjével. A homológia elsődlegesen a fehérjeláncok C-terminális régiójában nagy. Az OCTN2 fehérje, melynek molekulatömege 63 kDa, 557 aminosavból áll, feltételezhetően 12 putatív transzmembrán doménnel rendelkezik. A primer szisztémás karnitin deficienciában szenvedő betegek DNS analízise során számos mutációt mutattak ki az SLC22A5 gén szekvenciájában (4. táblázat).

4. táblázat A humán karnitin transzporter (SLC22A5) gén primer karnitin deficienciával társuló mutációi (Longo et al., 2006; Melegh, 2004)

Kodon	Exon	Nukleotid csere (cDNS)	Irodalom
	1	c.-91_22del113	Nezu et al. (1999)
M1I	1	c.3 G>T	Dobrowolski et al. (2005)
R2fsX137	1	c.4_5insC	Nezu et al. (1999)
Y4X	1#	c.12 C>G	Wang et al. (2001)
R19P	1	c.56 G>C	Wang et al. (2001)
Δ F22	1#	c.64_66delTTC	Lamhonwah et al. (2002); Amat di San Filippo et al. (2006)
S28I	1	c.83 G>T	Rahbeeni et al. (2002)
N32S	1#	c.95 A>G	Lamhonwah et al. (2002)

4. táblázat folytatása

Kodon	Exon	Nukleotid csere (cDNS)	Irodalom
P78fsX129	1	c.232delC	Amat di San Filippo et al. (2006)
R83L	1	c.248 G>T	Makhseed et al. (2004)
I89fsX133	1#	c.254_264dup11 GGCTCGCCACC	Wang et al. (2001); Lamhonwah et al. (2002)
W132X	2#	c.396 G>A	Koizumi et al. (1999); Nezu et al. (1999); Tang et al. (1999)
A142S@	2	c.424 G>T	Amat di San Filippo et al. (2006)
V153fsX193	2	c.457_458delTG	Dobrowolski et al. (2005)
R169W	3#	c.505 C>T	Wang et al. (2000b); Lamhonwah et al. (2002)
R169Q	3	c.506 G>A	Burwinkel et al. (1999)
M179L	3	c.535 A>T	Koizumi et al. (1999)
Y211C	3	c.632 A>G	Vaz et al. (1999)
	IVS3	c.652+1 G>A	Lamhonwah et al. (2002)
T232M	4	c.695 C>T	Dobrowolski et al. (2005)
G242V	4	c.725 G>T	Wang et al. (2000b)
R254X	4#	c.759 C>T	Tang et al. (2002)
W256X	4	c.768 G>A	Amat di San Filippo et al. (2006)
L269fsX295	4	c.806delT	Cederbaum et al. (2002)
W275X	5	c.825 G>A	Dobrowolski et al. (2005)
S280F	5	c.839 C>T	Amat di San Filippo et al. (2006)
R282fsX295	5#	c.839delC	Lamhonwah et al. (2002); Melegh et al. (2004)
R282X	5#	c.844 C>T	Burwinkel et al. (1999); Vaz et al. (1999); Wang et al. (1999)
R282Q	5	c.845 G>A	Amat di San Filippo et al. (2006)
W283R	5	c.847 T>C, c.847 T>A	Mayatepek et al. (2000); Amat di San Filippo et al. (2006)
W283C	5	c.849 G>T	Koizumi et al. (1999)
R289X	5	c.865 C>T	Dobrowolski et al. (2005)
A301D	5	c.902 C>A	Wang et al. (2000b)
T337fsX348	6	c.1008delA	Lamhonwah et al. (2002)
W351R	6	c.1051 T>C	Wang et al. (2000b)
Y387X	7	c.1161 T>G	Tang et al. (2002)
P398L	7	c.1193 C>T	Amat di San Filippo et al. (2006)
R399Q	7	c.1196 G>A	Wang et al. (2001)
Y401X	7#	c.1202_1203insA	Wang et al. (1999); Lamhonwah et al. (2002)
	IVS7	c.1267del+3_+23	Dobrowolski et al. (2005)
G435fsX458	8	c.1302delG	Wang et al. (1999)
T440M	8#	c.1319 C>T	Lamhonwah et al. (2002)
V446F	8	c.1336 G>T	Mayatepek et al. (2000)
Y447C	8#	c.1340 A>G	Rahbeeni et al. (2002); Amat di San Filippo et al. (2004)
Y449D	8	c.1345 T>G	Amat di San Filippo et al. (2004)
E452K	8	c.1354 G>A	Wang et al. (2000a)
S467C	8	c.1400 C>G	Koizumi et al. (1999)
T468R	8#	c.1403 C>G	Lamhonwah et al. (2002); Amat di San Filippo et al. (2006)
S470F	8	c.1409 C>T	Lamhonwah et al. (2002)
R471H	8	c.1402 G>A	Spiekerkoetter et al. (2003); Amat di San Filippo et al. (2006)
P478L	8	c.1433 C>T	Tang et al. (1999)
	IVS8	c.1451-G>A	Nezu et al. (1999)
R488H@	9	c.1463 G>A	Amat di San Filippo et al. (2006)

Jelölések: #: egynél több családban előforduló mutáció, @: ugyanazon allélon egy másik mutációval együtt előforduló mutáció

2.3.1.2. Primer miopátiás karnitin deficiencia

A primer miopátiás karnitin deficienciát (OMIM 212160) az jellemzi, hogy míg az izomban nagyon alacsony a karnitin szint, addig a szérumban normál marad (Pons et al., 1995). Ez a rendellenesség az izomra korlátozódik, a karnitin nem szivárog a vesén keresztül, és nincs jele a máj érintettségének sem. A klinikai kép progrediáló izomgyengeségből és lipid tárolási miopátia tüneteiből adódik, amelyet izom eredetű enzimek plazmaszintjének emelkedése kísér. A betegség az élet korai szakaszában (Shapira et al., 1993) vagy felnőtt korban (Angelini et al., 1987) kezdődhet. A betegség molekuláris háttere a karnitin efflux transzporter defektusa miatt fellépő fokozott szöveti karnitin vesztés.

2.3.2. Szekunder karnitinhányos állapotok

A szekunder karnitinhányos állapot, amely a plazmában vagy a szövetekben a karnitin szintek csökkenésében mutatkozik meg, valamilyen folyamatnak a másodlagos következménye. A szekunder karnitin deficiencia (5. táblázat) kapcsolatban lehet genetikailag meghatározott anyagcsere rendellenességekkel, szerzett rendellenességekkel vagy orvosi kezelés illetve gyógyszeres kezelés indukálta tényezőkkel (DeVivo et al., 1990). Ezekben az állapotokban klinikailag a karnitinhány tünetei jelentkeznek: hypotonia, izomgyengeség, májelégtelenség, hyperammonaemia, visszatérő infekciók, encephalopathia, hypoketotikus hypoglycaemia, metabolikus acidosis, kardiomiopátia, kardiomegalia, szívelégtelenség.

5. táblázat Karnitinhányos állapotok etiológiája (Pons et al., 1995)

- Primér karnitinhányos állapot
 - Szisztémás karnitin deficiencia
 - Miopátiás (izom) karnitin deficiencia
- Szekunder karnitinhányos állapotok
 - Genetikailag meghatározott anyagcsere hibák
 - A zsírsavoxidáció megbetegedései
 - Karnitin ciklus
 - Karnitin palmitoil-transzferáz I
 - Transzlokáz
 - Karnitin palmitoil-transzferáz II: gyermekkori és felnőttkori forma
 - β-oxidációs ciklus
 - Acil-CoA dehidrogenázok
 - Rövid szénláncú acil-KoA dehidrogenáz hiány

- Közepes szénláncú acil-KoA dehidrogenáz hiány
- Hosszú szénláncú acil-KoA dehidrogenáz hiány
- Nagyon hosszú szénláncú acil-KoA dehidrogenáz hiány
- Multiplex acil-KoA dehidrogenázok: súlyos, enyhe és riboflavin
reszponzív forma
- Rövid szénláncú 3-hidroxiacil-KoA dehidrogenáz hiány
- Trifunkciós fehérje
- 2,4-dienoil-KoA reduktáz
- Elágazó szénláncú aminosavak betegségei
 - Izovaleriánsav acidémia
 - Propionsav acidémia
 - Metilmalonsav acidémia
 - 3-metil-krotonil-KoA karboxiláz deficiencia
 - 3-metil-glutakonsav aciduria
 - 3-hidroximetil-glutaril-KoA liáz deficiencia
 - 2-metil-acetoacetyl-KoA tioláz deficiencia
- I. típusú glutársav aciduria
- Mitokondriális betegségek
 - Többszörös és izolált légzési lánc defektusok
 - NADH-ubikinon reduktáz deficiencia
 - Szukcinát citokróm C reduktáz deficiencia
 - Citokróm C oxidáz deficiencia
 - Mitokondriális ATPáz deficiencia
 - Kearn-Sayre szindróma
- Egyéb genetikai defektusok
 - 5-metilén-tetrahidrofolsav-reduktáz hiány
 - Adenozin deamináz deficiencia
 - Ornitin transzkarbamiláz deficiencia
 - I. típusú karbamil-foszfát szintetáz deficiencia
- Nem genetikai eredetű szindrómák
 - Williams-Beuren szindróma
 - Ruvalcaba-Myhre-Smith szindróma
- Szerzett rendellenességek
 - Csökkent bioszintézis
 - Cirrózis
 - Krónikus vesebetegség
 - Koraszülöttség
 - Csökkent felvétel
 - Krónikus teljes parenterális táplálás
 - Hiányos táplálkozás
 - Lakto-ovovegetáriánus és szigorúan vegetáriánus táplálkozás
 - L-karnitin pótlás nélküli csecsemőtápszeren történő táplálkozás
 - Felszívódási rendellenesség (cisztás fibrózis, rövid bélkacs-szindróma, coeliakia)
- Csökkent karnitinraktárak / emelkedett szükséglet
 - Terhesség, szoptatás
 - Koraszülöttség
 - Méhen belüli fejlődési visszamaradás
 - Karnitinhányban szenvedő anyák csecsemői
 - Kritikus állapotban lévő betegek (emelkedett lebontás)
 - Szerzett immunhiányos tünetegyüttes (AIDS)
- Megnövekedett karnitinvesztés
 - Fanconi szindróma
 - Renális tubuláris acidózis
- Orvosi kezelés vagy gyógyszerek indukálta deficiencia
 - Hemodialízis
 - Valproát
 - Pivampicillin
 - Emetin
 - Zidovudin

2.4. Gasztroenterológiai betegségek

2.4.1. Coeliakia

A coeliakia (más néven gluténszenzitív enteropathia, nem trópusi sprue, lisztérzékenység, idiopathiás steatorrhea) a vékonybél krónikus, malabsorptióhoz vezető betegsége, melyet genetikusan determinált egyéneknél az étkezéssel bevitt glutén idéz elő (Green et al., 2003; Shamir, 2003). Jellemző a vékonybélbolyhok atrophiája; ez és a felszívódás rendellenessége glutén megvonásra normalizálódik.

A provokáló anyag a glutén, ami a búza, a rozs és az árpa fehérjéje. Alkoholban oldódó prolaminokból és alkoholban nem oldódó gluteninekből áll. Újabb kutatások eredménye, hogy a prolaminok mellett a glutenineknek is van vékonybélnyálkahártya-károsító hatása. A károsító prolaminokra a magas glutamin- és prolintartalom jellemző. Különösen toxikus a búza α -gliadinja, az árpa hordeinje és a rozs szekalinja. A zab prolaminja, az avenin toxicitása kérdéses.

A coeliakia patogenezisében genetikai, környezeti és immunológiai tényezők játszanak szerepet: a jelenlegi ismeretek szerint a kórképet autoimmun patomechanizmusú szisztémás betegségnek tekintjük.

A betegség előfordulási gyakorisága a különböző országokban felvett statisztikák szerint más és más: Olaszországban iskoláskorú gyerekek bevonásával a prevalencia 1:184, Svédországban véradók között 1:256, Észak-Írországon 1:152, míg Írországon 1:300 gyakoriságról számoltak be (Parnell et al., 1999). A hazai prevalenciát Korponay-Szabó és mtsai vizsgálták gyermekekben, illetve a coeliakiás gyerekek családjában. Az általuk vizsgált 427 (3-6 éves) gyermekeknél 1:85 arányú előfordulást állapítottak meg (Korponay-Szabó et al., 1999).

A klinikai tünetek igen változatosak, a klasszikus vezető tünetek a nagytömegű, laza konzisztenciájú, nagy zsírtartalmú széklet és következményes anaemia, fogyás, meteorismus, gyengeség, fáradékonyság vagy állandó fáradtság érzése, vérzékenység, enterogén oedéma, a kalcium-anyagcsere zavara, tetaniform-görcsök, gyermekkorban a növekedés elmaradása, alacsony termet.

A coeliakiás betegek gyakorta oligoszimptomásak, az utóbbi időben azonban a klasszikus, malabsorptióval járó esetek száma csökkent és egyre gyakoribbak az atípusos tünetekkel járó esetek, megnehezítve a diagnózis felállítását. Tovább

bonyolítja a képet az ún. jéghegy elmélet (Maki et al., 1997), miszerint a coeliakiás betegek többségét – klinikai tünetek hiányában – nem ismerik fel, ezek az ún. silent (más néven szubklinikus), illetve a látens csoportba sorolhatók.

2.4.2. Gyulladásos bélbetegségek

A gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel disease, IBD) nem pontosan tisztázott etiopatogenezisű, idült lefolyású kórképek. Klinikai, radiológiai és szövettani jellemzők alapján két csoportra oszthatók: Crohn betegségre, illetve colitis ulcerosára. A betegek kb. 10 %-a azonban egyik csoportba sem sorolható („indeterminate” colitis).

Az IBD patogenezisére vonatkozó jelenlegi elképzelések szerint genetikusan fogékony egyéneknél a mucosalis barrier funkciózavara és bizonyos környezeti, elsősorban lumináris (pl. étrendi-bakteriális alkotórész) antigénekre adott diszregulált immunválasz következtében tartós, immunmediált gyulladás alakul ki (Fiocchi, 1998). Az immunválasz bizonyos lokális tünetek mellett szisztémás választ is jelent, ezért nem meglepő az egyéb szervi (extraintestinális) tünetek jelentkezése sem.

Az 1990-es évektől az ikervizsgálatok eredményei (Orholm et al., 2000), a családi halmozódás (Orholm et al., 1991) és az utóbbi időben az IBD családok teljes génállományának vizsgálati eredményei alapján valószínűsítették a genetikai tényezők szerepét a gyulladásos bélbetegségek kialakulásában. 1996 óta eddig hét, a betegségre hajlamosító génlókuszt azonosítottak a 16q12 (IBD1), 12q13 (IBD2), 6p13 (IBD3), 14q11 (IBD4), 5q31-33 (IBD5), 19p13 (IBD6) és 1p (IBD7) kromoszóma régiókban (Hugot et al., 1996; Satsangi et al., 1996; Cho et al., 1998; Duerr et al., 2000; Hampe et al., 1999; Rioux et al., 2000; Rioux et al., 2001). Ezek közül van amelyik az IBD-re általában, van amelyik csak a Crohn betegségre vagy a colitis ulcerosára hajlamosít.

A génállomány (genotípus) nemcsak a gyulladásos bélbetegségek kialakulására való fogékonyságot, hanem a klinikai fenotípust: a gyulladás lokalizációját, viselkedését, életkori megjelenését, az extraintestinalis szövődmények kialakulását, valamint a terápiás választ is befolyásolhatja.

2.4.2.1. Crohn betegség

A Crohn betegség (CD) idült, visszatérő betegség, melyet foltos, az egész bélfalra kiterjedő gyulladás jellemez és a gyomor-bél traktus bármelyik szakaszát érintheti a szájüregtől a végbélnyílásig. Az esetek 30-40 %-ában csak a vékonybél, 40-55 %-ban a vékony- és a vastagbél, 15-20 %-ban csak a vastagbél beteg. A vékonybél tehát az esetek 75 %-ában érintett, s ezen esetek 90 %-ában a terminális ileum részt vesz a betegségben. A betegség gyakoribb fehéreken, zsidókon, az érintett családon belül halmozódhat, s bár a tünetek tipikusan a 15-30 év között kezdődhetnek (Oliva-Hemker et al., 2002), az utóbbi időben a gyermekkori megbetegedések incidenciája erősen emelkedik (Baldassano et al., 1999).

A betegség hátterének felderítésére irányuló átfogó kutatások ellenére a Crohn betegség etiológiája még mindig ismeretlen. Feltételezések szerint a környezeti tényezők és immuneltérések mellett a genetikai szuszceptibilitásnak döntő szerepe van a betegség kialakulásában. Erőteljes heterogenitás figyelhető meg a betegség megjelenésében, viselkedésében és a kezelésre történő reagálásban is (Podolsky, 2002; Lakatos et al., 2004). Kísérletek történtek klinikai alcsoportok meghatározására, s napjainkban az 1992-ben létrehozott, majd 1998-ban átdolgozott Bécsi Klasszifikáció három klinikai paraméterét veszik figyelembe a Crohn betegség csoportokba való besorolásánál. Ezen paraméterek a következők: az életkor (A1:<40 év, A2:>40 év), a lokalizáció (L1:ileum, L2:colon, L3:ileocolonalis, L4:felső gastrointestinalis), valamint a betegség viselkedése [B1: gyulladós, B2: szűkületet okozó (stenotizáló), B3: penetráló (sipolyt okozó)].

A teljes humán genomon végzett ún. kapcsoltsági vizsgálatok számos génlókuszt azonosítottak, melyek potenciálisan CD-re hajlamosíthatnak. 2001-ben az IBD1 régióban három munkacsoport egymástól függetlenül azonosította a 16-os kromoszóma pericentromerikus régiójában a Crohn betegség patogenezisében szerepet játszó CARD15/NOD2 gént (Hampe et al., 2001; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). A génnek, s egyben a NOD2 intracelluláris fehérjének is (mely a vérből származó monocitákban, a Paneth-sejtekben és a bélhámsejtekben expresszálódik) a baktériumok felismerésében, az NF- κ B transzkripciós faktor aktiválásán keresztül az apoptózis fokozásában, végső soron a gyulladós folyamatok szabályozásában van jelentősége (Schreiber et al., 1998).

A kaukázusi populáción végzett számos tanulmány összefüggést mutatott ki a CARD15 mutációk és a CD között. A génnek három gyakori mutációját (R702W, G908R és 1007finsC) azonosították, mint független rizikófaktort a betegség kifejlődésében (Lesage et al., 2002; Sun et al., 2003; Tomer et al., 2003). A szerteágazó genetikai kutatások eredményeként újabb géneket találtak (TLR4, DLG5), melyek szerepet játszhatnak a CD patogenezisében. Az IBD5 lókuszt öt génjének újraszekvenálása során Peltekova és mtsai (Peltekova et al., 2004) két új polimorfizmust azonosítottak a karnitin/szerves kation transzporter gén klaszter két génjében (SLC22A4 és SLC22A5). Ez a két mutáció (SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C) egy két-allélos ún. rizikó haplotípust képez (OCTN-TC), mely haplotípus összefüggést mutat a Crohn betegséggel.

A változó lokalizációjú és különböző súlyosságú gyulladás miatt a betegség változatos panaszokkal és tünetekkel jelentkezhet. Lehetséges az éveken át meglévő atípusos tünetekkel (hasmenés, hasi panaszok) járó állapot, máskor a kezdet akut has képében indul (appendicitist utánozva), és septicus kórképet mutat. Anális és perianális elváltozások (fissura, fistula) szisztémás extraintestinalis tünetek (ízület, bőr, szem), az esetek egy részében évekkal megelőzhetik a hasi tüneteket. A vékonybélre lokalizált Crohn betegségben a jobb oldali alhasi fájdalom, hőemelkedés, esetenként láz, fogyás, anaemia, gyengeség, az esetek többségében hasmenés a betegek panasza. Véres, nyákos hasmenés vastagbél-érintettség esetén jelentkezik, görcsös fájdalmak szűkület jelenlétére utalnak.

A laboratóriumi eltérések nem specifikusak, a gyulladással járó reakció mértékével változnak: vvt-süllyedés, fehérvérsejt- és thrombocitaszám, a fibrinogén, a C-reaktív protein, a szérumalbumin szint. Az idült gyulladás, a malabsorpció és a vérvesztés mértékét tükrözi a haematokrit érték és a szérum vas szintje. A diagnózis felállításához a laboratóriumi paraméterek mellett endoszkópos, radiológiai, ultrahang, esetenként CT és/vagy MR vizsgálatra valamint a szövettani eredményekre van szükség.

A Crohn betegségnek ezidáig nincs specifikus terápiája, a kezelés jelenleg a panaszok csökkentésére és a kórfolyamat kézben tartására irányul. A CD kezelésében a következő gyógyszercsoportok kerülnek alkalmazásra: gyulladásgátlók (5-ASA, kortikoszteroidok), immunmodulánsok (Azatioprin, Methotrexat, Cyclosporin A), antibiotikumok (ciprofloxacín, metronidazol), biológiai szerek (Infliximab).

2.4.2.2. Colitis ulcerosa

A colitis ulcerosa a vastagbél nyálkahártyájának ismeretlen eredetű gyulladással járó betegsége, mely diffúz sorvadáshoz és vérzéssel járó eróziók kialakulásához vezet. A betegek körülbelül 50 %-ában a betegség a végbél sigma tájékra korlátozódik (proctosigmoiditis); 30 %-ban a flexura linealisig terjed (a bal colonfélre lokalizált colitis); és az esetek kevesebb, mint 20 %-a terjed proximálisabban (kiterjedt colitis). A vastagbél érintettségének nagysága az idő előrehaladtával a betegek többségénél nem nő.

A betegség multifaktoriális jellegéből adódóan feltételezhető, hogy genetikai, környezeti tényezők és az immunrendszer bonyolult kölcsönhatása fontos szerepet játszik a CU kialakulásában. Ezen kívül számos hipotézis foglalkozik a CU patogenezisével, ezek közül az egyik jelenlegi hipotézis fókuszában az áll, hogy a rövid szénláncú zsírsavak, - melyek az enterociták fő energiaforrásai – hozzáférhetősége lecsökken (Roediger, 1980). A humán vastagbélben az SCFA-k a fő anionok, ezek közül is az acetát van legnagyobb mennyiségben jelen, az átlagos koncentrációja 50-70 mmol/kg, a propionát szintje 20-25 mmol/kg, a butiráté 18-26 mmol/kg. Az SCFA-k elsődlegesen a táplálkozással bekerülő és a vékonybélben fel nem szívódott szénhidrátok bakteriális lebontásával keletkeznek (Cummings et al., 1987).

Az SCFA-k gyorsan szívódnak fel a vastagbélből és számos feladatuk van: energiaforrásul szolgálnak a colonocitáknak, izomszövetnek, befolyásolják a lipid anyagcserét, a vastagbél nyálkahártyájának véráramlását, az emésztőnedv kiválasztást, szabályozzák a colonociták növekedését és differenciálódását (Cummings et al., 1995). A vastagbél distalis részének hámsejtjei az energiát nagyrészt a butirát lebontásából kapják, bár sokkal kisebb sebességgel más anyagokat pl. glukózt vagy glutamint is képesek metabolizálni (Roediger, 1980). A distalis CU-ban szenvedő betegek székletének SCFA koncentrációja lehet emelkedett vagy mérsékelten csökkent, jelezve ezzel a megváltozott felszívódásukat (Roediger et al., 1982; Scheppach et al., 1992). A CU-ban úgy tűnik, hogy az SCFA oxidáció szenved károsodást, s feltételezhetjük, hogy a betegség kialakulásában az energia deficiencia az elsődleges esemény (Roediger, 1980).

A colitis ulcerosa klinikai képe igen változatos. Vezető panasz a gyakori hasmenés, véres székürítés, az aktív és inaktív periódusok váltakozása, a

fellángolások általában a téli hónapokra esnek. A székletek száma, a vérzés mennyisége általában megfelel az aktivitás mértékének, a hasmenés éjszaka is előfordul. A beteg gyenge, fáradékony, a székeléskor görcsös hasi fájdalma van. Súlyos aktivitás esetén hőemelkedés, láz, esetleg extraintestinalis (ízület, szem, bőr) szövődmények által okozott panaszok is megjelennek.

A különböző laboreltérések mellett, melyekből elsősorban a gyulladás mértékére tudunk következtetni (vvt-süllyedés, C-reaktív proteinszint, fibrinogénszint, alfa2-globulin, trombocitaszám, haematocrit, szérumvas- és albumin) a diagnózis felállításához az endoszkópos, radiológiai és patológiai leletek együttes értékelésére van szükség.

A colitis ulcerosának ezidáig nincs specifikus kezelése. A kezelés a panaszok megszüntetésére és a gyulladás visszaszorítására irányul. A jelenlegi terápia főként az orális vagy helyi (azaz rektális) 5-ASA vagy kortikoszteroid kezeléssel áll, melyek együttesen is alkalmazhatók. Ezek a vegyületek csökkentik az oxigéntartalmú szabadgyökök aktivitását, a proinflammatorikus citokinek felszabadulását és módosítják az arachidonsav metabolizmusának lipo- és ciklooxygenáz útvonalát (Podolsky, 1991). Ezen gyógyszerek mellett természetesen nagy az érdeklődés új készítmények iránt, melyek esetlegesen kevesebb mellékhatással rendelkeznek. Ilyen új, ígéretes készítmény lehet a helyileg alkalmazott propionil-L-karnitin a distalis colitis ulcerosa kezelésében (Gasbarrini et al., 2003).

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Az emberben zajló karnitin bioszintézis pontosabb megértése céljából deutériummal jelölt TML-t adva egészséges, érett újszülötteknek vizsgáltuk a karnitin bioszintézis intermedierjeinek megjelenését a vizeletben.
2. Primer karnitinhiányos betegekben, családtagjaikban és bölcsőhalálban elhunyt testvéreikben az *SLC22A5* gén molekuláris genetikai vizsgálata.
3. A karnitin terápia jelentőségének vizsgálata Leigh szindrómás betegen.
4. Gluténmentes diétán lévő coeliakiás betegek felszívódási rendellenességeinek karnitínészter profilra gyakorolt hatásának vizsgálata tömegspektrometrián.
5. A CARD15 gén variánsainak és a karnitíntranszporter gének (*SLC22A4* és *SLC22A5*) polimorfizmusainak a Crohn betegség patogenezisében játszott lehetséges szerepének molekuláris genetikai vizsgálata gyermek és felnőtt Crohnos betegpopulációban.
6. Az *SLC22A4* C1672T és az *SLC22A5* G-207C polimorfizmusok karnitínészter profilra gyakorolt hatásának vizsgálata felnőtt Crohnos populációban.
7. Colitis ulcerosában szenvedő betegek karnitin anyagcseréjének vizsgálata tömegspektrometrián.

4. MÓDSZEREK

4.1. A vizsgálatban résztvevő betegek

4.1.1. *A karnitin bioszintézisének tanulmányozása*

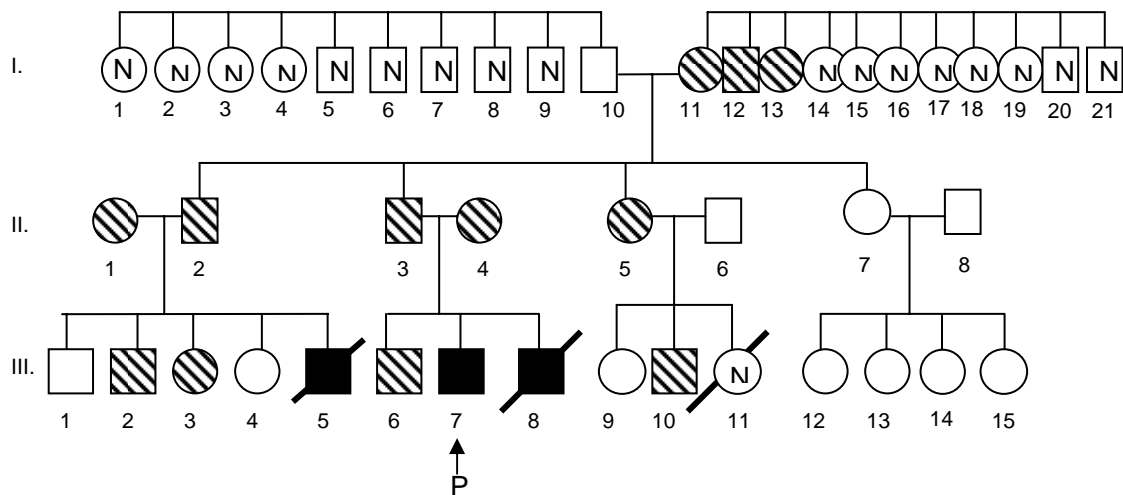
Tanulmányunkban hét orálisan táplált fiú újszülöttet vizsgáltunk. Az átlagos születési idejük $38,5 \pm 0,87$ hét volt (tartomány 38-41 hét). A vizsgálat kezdetekor postnatális koruk 8 nap (tartomány 5-11 nap) volt, születési súlyuk 3360 ± 100 g (tartomány 3100-4300 g). A csecsemőket 70 g Aptamil nevű tápszerrel etették hétszer naponta. A vizsgálat időtartama öt egymást követő napot foglalt magába. A vizsgálat nulladik napján, azaz a $N^6[Me-^2H_9]$ -TML adását megelőző napon, és az ötödik napon 24 órás vizeletgyűjtés történt. Az öt napos vizsgálati periódus alatt az újszülöttek $0,5$ mmol $N^6[Me-^2H_9]$ -TML-t kaptak naponta a tápszerrel.

A karnitin bioszintézis intermedierjeinek 24 órás vizeletből történő meghatározásához kontrollként 40 egészséges személyt (23 férfi, 17 nő) használtunk, átlag életkoruk 21 év volt (SD 17; tartomány 2-66 év).

4.1.2. *Primer karnitinhányos betegek*

A primer szisztémás karnitinhányos állapotok tanulmányozása során két, egymással rokonságban nem álló roma család tagjait vizsgáltuk. A molekuláris genetikai vizsgálatok során számos esetben sikerült az OCTN2 transzporter defektusát kimutatni heterozigóta vagy homozigóta formában.

Az egyik általunk vizsgált kiterjedt roma család családfája a 4. ábrán látható. A család 26 tagjától sikerült DNS mintát nyerni és elvégezni a molekuláris genetikai vizsgálatot 844delC mutációkeresés irányában.



4. ábra Az első primer szisztémás karnitinhiányos család családfája. (Jelölések: fehér: normál genotípusú egyén, csíkozott: heterozigóta egyén, fekete: homozigóta mutációt hordozó egyén, P: az általunk kezelt beteg, N: nincs DNS minta)

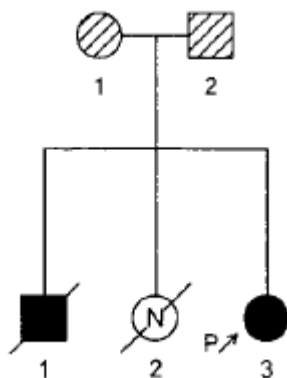
A családfán III/7-tel jelzett homozigóta fiú beteg kardiomiopátiáját 3 hónapos korában diagnosztizálták, a mellkasi röntgen felvételen kardiomegália volt észlelhető. Az EKG-n magas T-hullámok mutatkoztak, az ultrahang nem-obstruktív hypertrophiás kardiomiopátiát mutatott. A laboratóriumi vizsgálatok a májenzimek mérsékelt emelkedését mutatták: GOT 53, LDH 581, GPT 33, γ GT 10, ALP 413 U, ami hepatomegáliával társult. A karnitin terápia bevezetése után két hónappal (1 g/nap 3 hónapig, majd 2 g/nap, azaz 167 mg/testtömegkg négy egyenlő részre elosztva) az EKG rendellenesség eltűnt, a májenzimek normalizálódtak. Míg a karnitin kezelés előtt a csecsemő apatiás volt és spontán aktivitása súlyosan csökkent volt, a kezelést követően látványos javulás következett be.

A III/5-tel jelzett fiú beteg a bölcsőhalál klinikailag típusos esetének felel meg. Az eseménytelen perinatalis időszak után, mely alatt semmilyen jel nem utalt szisztémás megbetegedésre, 6 hónapos korában felső légúti infekció következtében kórházba került, és másnap exitált.

A családban egy másik, hirtelen bölcsőhalálban elhunyt fiú gyermek (III/8) koraszülöttként (31. hétre) kis súllyal (1750 g) jött a világra. A perinatalis és a korai postnatalis időszak eseménytelenül zajlott, azonban 6 hónapos korától visszatérő felső légúti infekciók jelentkeztek nála. Egyéves korában hepatomegáliát (2 cm) és kardiomegáliát diagnosztizáltak. 2 éves 9 hónapos korában felső légúti infekció miatt kórházba került, ahol egyhetes eseménytelen kezelést követően váratlanul jelentkező kardiális dekompenzációban elhalálozott.

A családfán III/11-el jelzett leány beteg egy komplikált szülés után rossz általános állapotban jött a világra. Gépi lélegeztetés mellett valószínűleg a súlyos perinatalis események következtében elhunyt.

A másik általunk vizsgált család (5. ábra) nem áll rokonságban az előzőekben leírt családdal. Az ország másik régiójában élnek már három generáció óta.



5. ábra A másik primer szisztémás karnitinhányos család családfája. (Jelölések: fehér: normál genotípusú egyén, csíkozott: heterozigóta egyén, fekete: homozigóta mutációt hordozó egyén, P: az általunk kezelt beteg, N: nincs DNS minta)

A II/3-mal jelzett leány gyermeknél 5 éves korában diagnosztizáltuk a karnitin transzporter defektusát. A klinikai kép növekedési elmaradást (<5% súly- és hossz-percentilis értékekek), enyhe izomfáradékonyságot, visszatérő infekciókat és enyhe kardiális dekompenzációt mutatott. A laboratóriumi vizsgálatok eredményei vashiányos anémiát jeleztek, a transzamináz, ammónia, laktát, piruvát értékek többszöri ismétlést követően is normál eredményt mutattak. Hypertrophiás kardiomiopátiát mutatott az echokardiographia és a mellkasi röntgen-felvétel, az EKG hullámokon éles, magas T-hullámok voltak láthatók. A karnitin terápia bevezetése (1g/nap karnitin egy éven át, majd 3x1 g/nap, azaz 150 mg/ttkg a mai napig) drámai javulást eredményezett a klinikai tünetekben; az EKG és ultrahangos eltérések megszűntek, látványos súlygyarapodás volt mérhető és az infekcióra való hajlam is csökkent.

A beteg nővére (II/2) minden előzmény nélkül, 5 hónapos korában hirtelen csecsemőhalálban meghalt. A beteg bátyja (II/1) számos infekció ellenére egészséges gyermek volt. Hat éves korában minden előzetes figyelmeztető jel nélkül, hirtelen meghalt az óvodában. A patológiai vizsgálat mindkét esetben dilatált kardiomiopátiát

és májsteatosist talált. A fiúgyermek (II/1) autopsziás tüdőszövetéből kaptunk mintát, melyből elvégeztük a molekuláris genetikai vizsgálatokat.

4.1.3. Anyai ágon öröklődő Leigh szindrómás beteg

Egy Leigh szindrómás betegben, akinek klinikai tünetei a súlyos cerebelláris ataxia, enyhe mentális retardáció és izom miopátia volt, a molekuláris genetikai vizsgálatok egy anyai ágon örökölhető 8993 T>C mutációt mutattak ki a mitokondriális DNS-ben heteroplazmiás formában (95 % mutáns forma a vázizomban és 88 % a vérsejtekben). Továbbá egy homoplazmiás 8860 A>G tranzíció (treonin → alanin csere) volt detektálható az ATPase 6-os génben mind a betegben és az anyában.

12 éves korában egy enyhe felső légúti fertőzés közben a beteg teljesen elvesztette a járóképességét. A plazma és az izom összkarnitin szintje szignifikánsan alacsonyabb volt (18,9 szemben a $42,6 \pm 3,25$ $\mu\text{mol/l}$ a plazmában és 687 szemben a 2440 ± 540 nmol/g nedves tömegre számítva az izomban), míg a plazma acilkarnitin profilja normál volt.

12 éves korában 50 mg/kg dózissal elkezdett karnitin terápia látványos klinikai javulást hozott, a beteg 1 hét elteltével ismét képes volt járni és további 3 hét elteltével már iskolába is járt. 13 éves korában a hirtelen súly és magasság növekedés hatására a beteg ataxiás lett és súlyos izomgyengeség volt tapasztalható nála. Miután a karnitin dózis a megnövekedett testtömeghez lett állítva, a beteg hamarosan felépült és ismét iskolába járt. A koponya MRI nem mutatott cerebelláris atrophia előrehaladást a karnitin terápia bevezetése óta.

4.1.4. Felnőttkori coeliakia

A coeliakia klasszikus formájával rendelkező 33 felnőtt (9 férfi, 24 nő, átlagéletkor: $32,2 \pm 2,5$ év), valamint 35 gondosan kiválasztott, kor, nem, súly és testmagasság alapján megfelelő, klinikailag egészséges kontroll személy szérum mintáját (22 férfi, 13 nő, átlag életkor: $31,0 \pm 1,9$ év) vizsgáltuk meg.

Betegeinknél a coeliakia megállapításához az alábbi diagnosztikus kritériumokat alkalmaztuk: a vékonybél biopszia specifikus hisztológiai eltéréseinek megerősítése a módosított Marsh klasszifikáció (Oberhuber et al., 1999) szerint,

pozitív szerológiai eredmények (endomysium-ellenes antitest, szöveti transzglutamináz), egyértelmű klinikai javulás gluténmentes diétára. A vizsgálatból kizártuk azokat a betegeket, akik a coeliakia bármilyen ritka manifesztációjával rendelkeznek. Az összes beteg legalább 17 éves volt a betegség diagnózisának megállapításakor és legalább egy éve folyamatos gluténmentes diétát folytattak a karnitínészter profil vizsgálatának elvégzésekor. Az összes beteg hosszú ideig tartó vas helyettesítő terápiát kapott orálisan. Mind a beteg, mind a kontroll csoportban az alábbi kizárási kritériumokat vettük figyelembe: bélatrophia másodlagos okai, szisztémás betegségek, bármilyen malformáció, endokrin betegségek, bármilyen gyógyszer szedése, bizonyítottan bakteriális bélfertőzés, előzmény vagy bizonyíték bármilyen öröklődő metabolikus betegségre, ide értve a glukóz vagy lipid metabolizmus károsodásával járókat, dohányzás, máj vagy vesebetegség, terhesség.

4.1.5. Crohn betegség

Gyermek Crohn betegpopuláció genotípus vizsgálatához

Genetikai vizsgálatainkhoz az SZTE Gyermekgyógyászati Klinikáról származó 19 gyermek (14 fiú, 5 lány, átlag életkoruk: 13,4 év) és a PTE OEC I. számú Belgyógyászati Klinikáján kezelt 55 felnőtt Crohn beteg DNS mintája állt a rendelkezésünkre (felnőttkori betegség kezdettel rendelkező 27 férfi, 28 nő, átlag életkoruk:42,3 év). Kontrollként 49 klinikailag egészséges, kor és nem alapján megfelelő személyt (28 fiú, 21 lány, átlag életkoruk:14,4 év) vizsgáltunk. Mind a gyermek, mind a felnőtt CD betegek különböző klinikai tünetekkel rendelkeztek, így egy klinikai szempontból ún. vegyes CD populációt alkottak. A diagnózist klinikai, radiológiai, endoszkópos és hisztológiai eredmények együttesen támasztották alá.

Felnőtt Crohn betegpopuláció genetikai és karnitin anyagcsere vizsgálatához

Genetikai vizsgálataink során a PTE OEC I. számú Belgyógyászati Klinikáján és a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján diagnosztizált Crohn betegségben szenvedő 100 felnőtt beteg (47 férfi, 53 nő, átlag életkor: 37,3 év, életkori tartomány: 18-87 év), valamint 94 gondosan kiválasztott, kor, nem, súly és testmagasság alapján megfelelő klinikailag egészséges kontroll személy (47 férfi,

47 nő, átlag életkor: 45,6 év, életkori tartomány: 23-80 év) DNS mintáját tanulmányoztuk. A karnitin anyagcsere vizsgálatokhoz 85 (38 férfi, 47 nő, átlag életkor: 38,3 év, életkori tartomány: 18-73 év) betegtől és 48 (22 férfi, 26 nő, átlag életkor: 33,9 év, életkori tartomány: 19-70 év) kontroll személytől állt rendelkezésünkre éhgyomri szérum minta.

A betegség diagnózisának felállítása a betegek kórtörténetén, klinikai tüneteiben, a széklet vizsgálatának negatív bakteriális, illetve parazita eredményén, valamint a kolonoszkópia hisztológiai eredményein alapulnak. Mind a beteg, mind a kontroll csoportban az alábbi kizárási kritériumokat vettük figyelembe: másodlagos okok vékonybél és/vagy vastagbél betegségre, szisztémás betegségek, bármilyen malformáció, bizonyított bakteriális bélfertőzés vagy egyéb fertőzés, előzmény vagy bizonyíték bármilyen öröklődő metabolikus betegségre, máj vagy vese betegség, terhesség.

4.1.6. Colitis ulcerosa

Vizsgálataink során 44 colitis ulcerosában szenvedő felnőtt beteget (25 férfi, 19 nő, átlag életkoruk: 39,7 év, életkori tartomány: 17-65 év), valamint 44 gondosan kiválasztott, kor, nem, súly és testmagasság alapján megfelelő, klinikailag egészséges kontroll személy szérum mintáját (20 férfi, 24 nő, átlag életkoruk: 37,0 év, tartomány: 23-60 év) tanulmányoztuk. A kontroll személyek nem részesültek semmilyen gyógyszeres kezelésben, míg a CU-s betegek sulfasalazin vagy 5-amino-szalicilsavas (5-ASA) kezelést kaptak. Azt feltételeztük, hogy ezeknek a gyógyszereknek nincs hatásuk a karnitin státuszra, mivel erre vonatkozó adatot nem találtunk az irodalomban.

A betegség diagnózisának felállítása a betegek kórtörténetén, klinikai tüneteiben, a széklet vizsgálatának negatív bakteriális ill. parazita eredményén, valamint a rectoscopia és/vagy kolonoszkópia hisztológiai eredményein alapultak. Vizsgálatainkból kizártuk azokat a betegeket illetve kontrollokat, akiknél az alábbi kritériumok bármelyike előfordult: vastagbélbetegség másodlagos okai, szisztémás betegségek, bármilyen malformáció, bizonyított bakteriális bélfertőzés, előzmény vagy bizonyíték bármilyen öröklődő metabolikus betegségre, máj- vagy vesebetegség, terhesség.

Az általunk vizsgált betegek és kontroll személyek részletes felvilágosítást követően beleegyezésüket adták a mintáik kutatási célú felhasználásához. Munkánk során mindvégig a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Etikai Bizottsága által megállapított szabályokat és a nemzetközi irányelveket követtük.

4.2. Alkalmazott analitikai módszerek

4.2.1. A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata vizeletben HPLC-ESI tandem tömegspektrometria alkalmazásával

Mintaelőkészítés

A vizelet minták tárolása 4 °C-on történt, ha 1 héten belül mérésre került, egyébként -20 °C-on a mérésig. A vizelet kreatinin koncentrációját hagyományos lúgos kreatinin-pikrát módszerrel határoztuk meg (Henry, 1964). A vizelet mintákat 10000 g fordulatszámra 5 percig centrifugáltuk a törmelék eltávolítása céljából, majd a tiszta vizelet egy részét 1 mmol/l kreatinin koncentrációra hígítottuk. Azokat a vizelet mintákat, amelyek kreatinin koncentrációja < 1 mmol/l, hígítás nélkül használtuk. 100 µl vizelet mintát derivatizáltunk klórhangyasav metilészterrel. A klórhangyasav metilészter a primer, szekunder és a tercier aminocsoporttal reagál, a kvaterner aminocsoporttal viszont nem. Mind a TML és a HTML tartalmaz primer aminocsoportot, így reagál a klórhangyasav metilészterrel miközben a megfelelő 2-N-metilformil-N⁶-TML és 2-N-metilformil-3-hidroxi-N⁶-TML képződik. A karnitin és a γBB nem reagál a klórhangyasav metilészterrel. A zavaró vegyületek (különösen az aminosavak) azonnal reagálnak a klórhangyasav metilészterrel és a vizsgálandó vegyületektől etil-acetáttal történő savas extrakcióval elválaszthatók. A karnitin bioszintézis köztitermékei azonban a vizes fázisban maradnak a pozitív töltésű kvaterner aminocsoportjuknak köszönhetően.

25 µl belső standardot (25 µmol/l N⁶[Me-²H₉]-TML vagy N⁶[Me-²H₆]-TML, 25 µmol/l 4-N-[Me-²H₃]- γBB és 25 µmol/l 4-N-[Me-²H₃]-karnitin) és 20 µl 1,5 mol/l NH₄OH és 0,5 mol/l nátrium foszfát puffer (pH=7,2) 1:3 arányú elegyét adtuk minden egyes vizelet mintához. A derivatizáció 20 µl klórhangyasav metilészter

hozzáadásával indult. Szobahőmérsékleten történő 5 perces inkubálás után a reakció 40 µl 40 ml/l heptafluorovajsav hozzáadásával állítottuk le. A reakcióelegyet 1 ml etil-acetáttal extraháltuk és a vizes fázisból 5 µl-t injektáltunk a HPLC-tandem MS rendszerbe. A reakcióelegy 4 °C-on néhány hétig stabil.

HPLC-tandem MS rendszer

A HPLC rendszer HP 1100 bináris gradiens pumpából, vákuum degasserből, HP kolonna termosztátból állt és egy Gilson 231 XL mintaadagolóhoz volt csatlakoztatva. Az alkalmazott mintahőmérséklet 4 °C volt, analitikai oszlopként Aqua analitikai kolonnát (250 x 2,0 mm; részecske méret 5 µm; Phenomenex), míg előtétoszlopként SecurityGuard C₁₈ ODS (4 x 2,0 mm; Phenomenex) kolonnát használtunk. A kolonna hőmérséklete 15 °C volt. A mozgó fázis A: 11 ml/l heptafluorovajsav és B: 900 ml/l metanolból állt. Elválasztás során az alábbi lineáris gradiens elúciót alkalmaztunk: 0-3 perc 95 % A, 3-6 perc 95 % A → 50 % A, 6-8 perc 50 % A → 30 % A, 8-9 perc 30 % A → 0 % A, 9-10 perc 0 % A, 10-16 perc ekvilibrálás 95 % A-val. Az áramlási sebesség 0,3 ml/perc, a teljes analízis idő (beleértve az ekvilibrálás idejét is) 16 perc volt. A HPLC oszlop és a tömegspektrométer közé egy pontos splitter volt beépítve (split arány = 1:20), mely segítségével az oszlopról lejövő eluátum 15 µl/perc áramlási sebességgel jutott be a tömegspektrométerbe. Egy elektromosan szabályozott szelep segítségével az eluátumnak csak az 5,5 és a 16 perc közötti része jutott be a tömegspektrométerbe, megóvva ezzel a készüléket a korán eluálódó só szennyeződésektől. Micromass Quattro II tandem tömegspektrométert használtunk pozitív elektropray ionizációs módban. Nitrogén volt a vivőgáz és a szárítógáz, argon az ütközési gáz. Az ütközési cella nyomása 0,25 Pa, a forrás hőmérséklete 80 °C, a kapilláris feszültség 3,5 kV volt. Detektálás során multiple-reaction monitoring üzemmódban minden egyes analit egy specifikus átmenetét vizsgáltuk. A vizsgált átmenetek, az alkalmazott kónusz feszültségek és az ütközési energiák a 6. táblázatban találhatóak.

6. táblázat ESI+ módban a mérés során vizsgált átmenetek, alkalmazott kónusz feszültség és ütközési energia értékek

Vegyület	Tömeg, Da	Anyaiion, m/z	Leányion m/z	Kónusz feszültség (V)	Ütközési energia (eV)
2-N-metilformil-TML	247	247	142	35	25
2-N-metilformil-[² H ₉]-TML	256	256	142	35	25
2-N-metilformil-[² H ₆]-TML	253	253	142	35	25
2-N-metilformil-HTML	263	263	158	20	20
2-N-metilformil-[² H ₉]-HTML	272	272	158	20	20
γBB	146	146	87	25	15
² H ₃ -γBB	149	149	87	25	15
² H ₉ -γBB	155	155	87	25	15
Karnitin	162	162	103	35	16
[² H ₃]-karnitin	165	165	103	35	16
[² H ₉]-karnitin	171	171	103	35	16

N⁶-[Me-²H₉]-TML és N⁶-[Me-²H₆]-TML szintézise

Az N⁶-[Me-²H₉]-TML-t L-lizin HCl-ből (Sigma) szintetizáltuk az alábbi módon [Me-²H₆]-dimetil-szulfátot (Isotec) használva metil donorként. 2 g L-lizint oldottunk 20 ml desztillált vízben, majd 2 g bázikus CuCO₃-at adtunk hozzá és 10 percig forraltuk a reakcióelegyet. (Bázikus CuCO₃ preparálása lásd Melegh et al., 1999). A reakcióelegyet lehűtöttük szobahőmérsékletre és Whatman 3 MM szűrőpapíron leszűrtük. A tiszta szűrlethez 4 ml deuterált dimetil-szulfátot adtunk 20 °C-on, majd 13 ml 100g/l koncentrációjú NaOH oldatot csöpögtettünk hozzá állandó keverés közben. A deuterált TML-t tartalmazó oldatot 4 ml Dowex 50Wx8 kationcserélő gyantán tisztítottuk. Az oszlopot először 10 térfogat desztillált vízzel mostuk, majd az oszlopra kötött N⁶-[Me-²H₉]-TML-t 120 ml 2 mol/l NH₄OH-val eluáltuk. Az eluátumot bepároltuk és liofilizáltuk. A kémiai tisztaságot, ami >98 % volt, vékonyréteg kromatográfiásan és NMR spektroszkópiával ellenőriztük. Az izotóp tisztaságot, ami > 99 % volt, tandem MS módszerrel ellenőriztük.

Az N⁶-[Me-²H₆]-TML-t az előzőekben leírtak szerint szintetizáltuk, kiindulásként azonban L-lizin helyett N⁶-metil-L-lizin HCl-t alkalmaztunk.

4-N-[Me-²H₃]- γ BB szintézise

A 4-N-[Me-²H₃]- γ BB-t 4-N-dimetilaminovajsav HCl-ből (Sigma) szintetizáltuk az alábbi módon [Me-²H₃]-metil-jodidot (Sigma) használva metil-donorként. 1 g (6mmol) 4-N-dimetilaminovajsavat oldottunk 1 ml desztillált vízben, összekevertük 3,16 g (10mmol) Ba(OH)₂·8H₂O 20 ml desztillált vízben készült oldatával, majd hozzáadtunk 200 ml metanolt. 600 μ l (9mmol) [Me-²H₃]-metil-jodid hozzáadását követően a reakcióelegyet szobahőmérsékleten kevertettük egy éjszakán át. Az elegyet ~ 20 ml térfogatra bepároltuk, majd hozzáadtunk 20 ml desztillált vizet. A bárium ionokat 3-4 ml 2 mol/l H₂SO₄ hozzáadásával BaSO₄ formában kicsaptuk és a csapadékot centrifugálással eltávolítottuk. A felülúszót ~ 7 ml 2 mol/l NaOH hozzáadásával lúgossá tettük, majd az elegyet 4 órán keresztül 65 °C-on inkubáltuk. Az elegyet bepároltuk rotadeszten, a maradékot feloldottuk 1 mol/l HCl-ben, majd 150 ml CCl₄-dal extraháltuk. A vizes fázist 1-2 ml-re bepároltuk rotadeszten. A 4-N-[Me-²H₃]- γ BB-t Dowex ioncserés kromatográfiásan tisztítottuk a deuterált TML-hez hasonló módon.

4.2.2. A plazma és szérum karnitínészter profiljának vizsgálata ESI triple quadrupol tandem tömegspektrometriával

Mivel az éhezés és a táplálkozás a karnitínészterek dinamikus változását eredményezhetik a keringésben, ezért a karnitínészter profil meghatározásához reggel 8:00 és 8:30 között, egy 12 órás éhezést követően gyűjtöttünk natív vérmintát minden betegtől és kontroll személytől.

A szérum, illetve plazma acilkarnitinjének mennyiségi meghatározását izotóp hígításos tömegspektrometriás módszerrel butil-észter formában végeztük el Micromass Quattro Ultima ESI triple quadrupol tömegspektrométerrel. Az alkalmazott módszer Vreken és mtsai (1999) által leírt módszer módosított változata volt.

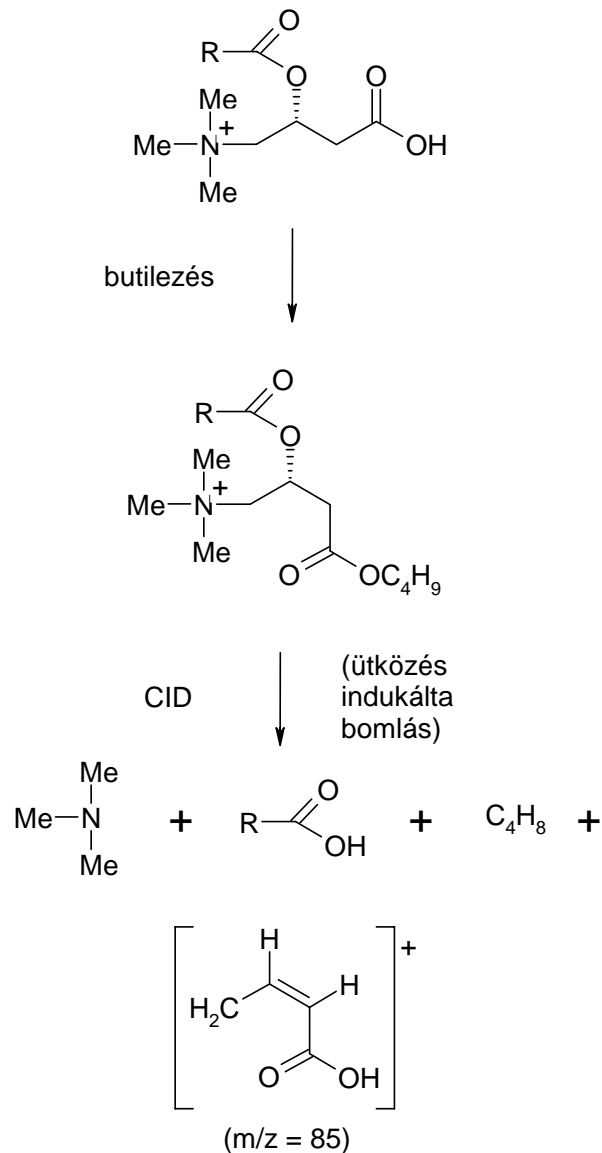
Mintaelőkészítés:

A vérből centrifugálással (3.000 rpm, 15 perc) nyertünk szérumot, illetve plazmát, amelyet felhasználásig -80 °C hőmérsékleten tároltunk. 10 µl vortexeléssel homogenizált mintát szűrőpapírra cseppentettünk, és 2 órán át hagytuk beszáradni, majd a teljes mennyiséget kivágva Eppendorf csőbe tettük. Hozzáadtunk 200 µl deuterált belső standardot tartalmazó metanolos törzsoldatot (mely 0,76 µmol/l [²H₃]-szabad karnitint, 0,04 µmol/l [²H₃]-propionil karnitint, 0,04 µmol/l [²H₃]-oktanoil karnitint és 0,08 µmol/l [²H₃]-palmitoil karnitint tartalmaz). 20 perces rázás után a felülúszót átpipettáztuk egy másik Eppendorf csőbe és 40 °C-on nitrogénnel bepárooltuk. A kémiai módosítást 100 µl 3 mol/l butanolos HCl hozzáadásával 65 °C-on 15 percig történő inkubálással végeztük. A kapott elegyet 40 °C-on nitrogénnel szárazra párooltuk és 100 µl eluensben (acetonitril:víz = 80:20) feloldottuk.

ESI-MS-MS analízis

Mintabeviteli rendszerként egy Waters 2795 HPLC készüléket (Waters Corporation, Milford, MA, USA) alkalmaztunk. Az eluens összetétele acetonitril:víz=80:20, az áramlási sebesség 100 µl/perc, az injektált mintamennyiség 10 µl volt.

Az acilkarnitinek illetve a szabad karnitin tömegspektrometriás meghatározása azon az elven alapszik (6. ábra), hogy butil-észter formában minden vizsgált analitból az ütközési cellában lejátszódó ütközés indukálta disszociáció hatására keletkezik egy 85-ös m/z-számú pozitív töltésű ion. Az ESI-MS/MS analízis során így a szabad karnitint és az acilkarnitineket a 85-ös m/z-számú ion pozitív prekursor ion scan módjában határoztuk meg, pásztázási tartomány m/z:200-550 volt. Az alkalmazott kapilláris feszültség 2,52 kV, a kónusz feszültség 55V, míg az ütközési energia 26eV volt. A forrás hőmérséklete 100 °C volt, vivőgázként nitrogént, ütközési gázként argont alkalmaztunk. A teljes analízisidő 4 perc/minta, a mérés során kapott eredmények 3 párhuzamos injektálás átlagaként adódtak. A mérésekhez és a számításokhoz a MassLynx 4.0 szoftvercsomagot használtuk.



6. ábra Származékképzés és fragmentáció. Az acilkarnitinek az R-csoport szerkezetében térnek el egymástól. Tömegspektrometriás meghatározásuk alapja, hogy butil-észter származékképzést követően azonos tömegszámú fragmentumot eredményeznek.

4.3. Molekuláris genetikai módszerek

4.3.1. A mitokondriális ATPase6 gén mutáció vizsgálata direkt szekvenálással

A mitokondriális ATPase6 génjének direkt szekvenálással történő meghatározásához három átfedő, génspecifikus primerpárt terveztünk. A PCR reakció és a szekvenálás során alkalmazott primerek szekvenciái a 7. táblázatban találhatóak. A reakcióelegy 50 µl végtérfogatban 1 µg DNS-t, 0,2 µM forward és reverse primert, 5 µl reakciópuffert (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0) és 15mM MgCl₂), 2 U

Taq polimeráz enzimet, a négy dNTP-t 200 μ M koncentrációban és 2 mM MgCl₂-t tartalmazott. A polimeráz láncreakciót 35 cikluson keresztül egy MJ Research PTC-200 thermal cycler készülékben végeztük az alábbi hőprogramot használva: elődenaturáció 95 °C-on 2 percig, denaturáció 95 °C-on 30 sec-ig, primerkötődés 62 °C-on 30 sec-ig, és lánchosszabbítás 72 °C-on 30 sec-ig, majd végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 percig.

A DNS szekvenáláshoz a PCR során kapott termékeket BigDye Terminator fluoreszcens láncterminációs festékekkel jelöltük és ABI Prism 3100 Genetic Analyzer automata szekvenáló készüléken analizáltuk a gyártó utasítása szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

7. táblázat A mitokondriális ATPase 6-os génjének felerősítéséhez és szekvenálásához alkalmazott primerek

MATP6-1F:	CACAAACTACCACCTACCTCCCTC
MATP6-1R:	GTGTAATGAGTGAGGCAGGAGTC
MATP6-2F:	CAACACTAAAGGACGAACCTGATCTC
MATP6-2R:	GAGTAGGTGGCCTGCAGTAATGTTAG
MATP6-3F:	ACCTACACCCCTTATCCCCATAC
MATP6-3R:	GATAGGCATGTGATTGGTGGGTC

4.3.2. Az *SLC22A5* mutációk vizsgálata RFLP analízissel és direkt szekvenálással

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz a DNS izolálása perifériás EDTA-s vérből rutin kisózásos módszerrel történt. Az autopsziás minták esetében a beágyazott minták paraffinos metszeteiből egy xilán-alapú rutin deparaffinizációs eljárást követően nyertük ki a DNS mintát (Man et al., 2001).

Az *SLC22A5* gén 10 exonjának direkt szekvenálással történő vizsgálatához általunk tervezett primerpárokat használtunk (8. táblázat). Az exon/intron határok pontos megállapítása céljából a primerpárok mindkét tagja intronban helyezkedett el. A módszertervezés során a GenBank adatbázisban található szekvenciákat használtuk (accession no. AB016625-t a genomiális szekvenciához és az NM_003060-t az mRNS szekvenciához). Mivel a gén 1. exonja a szekvenálással történő meghatározáshoz túl nagy volt, ezért ezen exon felerősítéséhez két átfedő primerpárt alkalmaztunk (OCE1aF-OCE1aR és OCE1bF-OCE1bR). A PCR reakciót MJR PTC 200 thermal cycler készüléken 50 μ l végtérfogatban végeztük. A reakcióelegy kb. 10-20 ng DNS-t, a primerpár mindkét tagjából 3 pmol-t, 5 μ l 10x hígítású reakciópuffert (50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0) és 0.1% Triton X-100 végső koncentrációval),

2 U Taq polimeráz enzimet, a négy dNTP-t 0,2 mM koncentrációban és 1,5-2,5 mM MgCl₂-t tartalmazott. Az összes exon esetében hasonló körülményeket alkalmaztunk. A polimeráz láncreakció során az alábbi hőprogramot alkalmaztuk: elődenaturáció 95°C-on 2 percig, primerkötődés 58 °C-on 1 percig, ezt követően amplifikáció 40-44 cikluson keresztül az alábbi ciklusokkal: denaturáció 94 °C-on 1 percig, primerkötődés 58 °C-on fél percig, majd elongáció 72 °C-on fél percig. A reakciót egy végső lánchosszabbítással zártuk le 72 °C-on 10 percig hagyva a reakcióelegyet.

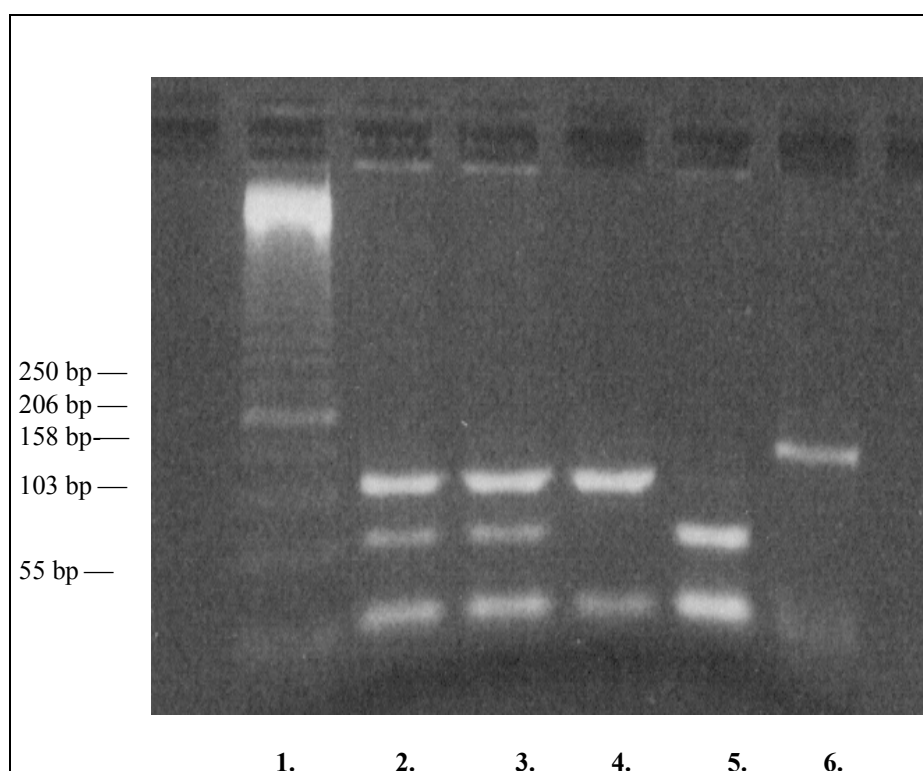
Amikor a beágyazott metszetekből izolált DNS minősége nem volt megfelelő, az 5. exon felerősítéséhez egy nested (beágyazott) PCR rendszert alkalmaztunk. Először felerősítettük az 5. exont az OCE5F és OCE5R intronból induló primerpárokkal, majd egy újabb PCR reakciót hajtottunk végre, ahol templátként az előző PCR reakció elegyét használtuk, és primerként az 5. exonra specifikus OCE5eF és OCE5eR primereket alkalmaztuk. (8. táblázat).

A DNS szekvenáláshoz a PCR során kapott termékeket BigDye Terminator fluoreszcens láncterminációs festékkel jelöltük és ABI Prism 310 Genetic Analyzer automata szekvenáló készüléken analizáltuk a gyártó utasítása szerint (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

8. táblázat Az SLC22A5 gén 10 exonjának felerősítéséhez és szekvenálásához alkalmazott primerek

OCE1aF:	CCAAGCCCCGCCGCGTTCC
OCE1aR:	GCAGCCGCAGTGGGACAGTG
OCE1bF:	CCTGTCCTCCGTGTTCTG
OCE1bR:	GTTCAAGGACCGCGACAG
OCE2F:	TGAATGATACACCCCTTTGCTCATC
OCE2R:	CACGCTTCTTCTCAGTGCTGAGGTC
OCE3F:	GCTGCCCTTTTCCAGCTGGTTAT
OCE3R:	TCAACTCCAACCTGATGGCCATA
OCE4F:	TGCTAACTCGACCTCCCTTGTTTT
OCE4R:	GACAGAAATCATCCTGCCAGTGG
OCE5F:	GAGGCCTCACTGAGATTGGACCTT
OCE5R:	TCACGGTCAGTCTGTCCCTCTCA
OCE5eF:	CCTTATTCCCACCTATGG
OCE5eR:	GACGATTTGAAGAGGCAG
OCE6F:	TCTCTGACCACCTCTTCTTCCCATACACTT
OCE6R:	GTCTGGAAGCCTCAGGCAGGTCTCTTTTA
OCE7F:	CCAGCTTTCTTCTGCACTCTGTTT
OCE7R:	CCCAAACCATAGATGCACATGGT
OCE8F:	GTTGGTACCTACTCCTACCCTCTTTCTT
OCE8R:	CTCTAGTGTGCCCTTGGCTCATG
OCE9F:	GGGTAGATGAGAGACCAAGTCTAAC
OCE9R:	AACTGACAGAGGAGGTCTTCTT
OCE10F:	TGTTTGTGGGAGACTGGGAGGCATCTTTT
OCE10R:	TGGCCATTTCTGGCAAGACAGTCTTTC

A 844delC mutáció vizsgálatát RFLP (restriction fragment length polymorphism) analízissel végeztük. Az 5. exon amplifikátumát (az OCE5F és OCE5R primerek által felerősített 206 bp hosszúságú terméket) *Bsl* I enzimmel emésztettük. Amennyiben nincs jelen bázisdeléció, az emésztés során 48, 55 és 103 bp nagyságú termékeket detektálunk. Homozigóta formában jelenlévő bázisdeléció megszüntette az egyik hasítási helyet, így egy 48 bp és egy 157 bp hosszúságú szakaszt detektáltunk az agaróz gélelektroforézis során (7. ábra).



7. ábra RFLP a második család tagjainak mintáival. (1.sáv: marker, 2: apa, 3: anya, 4: homozigóta beteg, 5: normál kontroll, 6: emésztetlen PCR termék).

4.3.3. A *CARD15* gén mutációinak vizsgálata direkt szekvenálással

A molekuláris genetikai vizsgálatokhoz a DNS izolálása perifériás EDTA-s vérből rutin kisózásos módszerrel történt. A *CARD15* gén három leggyakoribb mutációjának (R702W, G908R és 1007finsC) direkt szekvenálással történő meghatározásához génspecifikus primerpárokat terveztünk. A PCR reakció és a szekvenálás során alkalmazott primerek szekvenciái a 9. táblázatban találhatóak. A reakcióelegy 50 μ l végtérfogatban 1 μ g DNS-t, 0.2 μ M forward és reverse primert,

5 µl reakciópuffert (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0) és 15mM MgCl₂), 2 U Taq polimeráz enzimet és 200 µM koncentrációban mind a négy dNTP-t tartalmazta. A polimeráz láncreakciót 35 cikluson keresztül, egy MJ Research PTC-200 thermal cycler készülékben végeztük az alábbi hőprogramot használva: elődenaturáció 95 °C-on 2 percig, denaturáció 95 °C-on 30 sec-ig, primerkötődés 50 °C-on 30 sec-ig, és lánchosszabbítás 72 °C-on 30 sec-ig, majd végső lánchosszabbítás 72 °C-on 5 percig.

A DNS szekvenáláshoz a PCR során kapott termékeket BigDye Terminator fluoreszcens láncterminációs festékekkel jelöltük és ABI Prism 3100 Genetic Analyzer automata szekvenáló készüléken analizáltuk a gyártó utasítása szerint.

9. táblázat A CARD15 gén variánsainak meghatározása során alkalmazott primer szekvenciák.

	Variáns	Primerek
NOD2/CARD15	R702W	F: GAGCCGCACAACCTTCAGATC R: ACTTGAGGTGCCCAACATTCAG
	G908R	F: GTTCATGTCTAGAACACATATCAGG R: GTTCAAAGACCTTCAGAACTGG
	1007finsC	F: CCTTGAAGCTCACCATTGTATC R: GATCCTCAAAATTCTGCCATTC

4.3.4. Az SLC22A4 és SLC22A5 gén polimorfizmusok vizsgálata direkt szekvenálással

A gyermek és felnőtt Crohn betegek és kontrolljaik SLC22A4 C1672T és SLC22A5 G-207C genotípusainak meghatározása direkt szekvenálással történt az általunk tervezett primerekkel. A PCR reakció és a szekvenálás során alkalmazott primerek szekvenciái és a primerkötődés hőmérséklete a 10. táblázatban található. A vizsgálat során alkalmazott körülmények azonosak voltak a CARD15 gén mutációinak detektálása során alkalmazottakkal.

10. táblázat SNP genotipizálás során alkalmazott primer szekvenciák és primerkötődési hőmérsékletek.

	SNP	Primerek	T _{annealing}
SLC22A4	C1672T	F: AGAGAGTCCTCCTATCTGATTG R: TCCTAGCTATTCTTCCATGC	54 °C
SLC22A5	-G207C	F: AGTCCCGCTGCCTTCCTAAG R: GTCACCTCGTCGTAGTCCCG	58°C

4.4. Statisztikai módszerek

A különböző csoportok szérumban karnitin eredményeinek összehasonlítására Student féle páratlan t-próbát alkalmaztunk. Az értékeket az átlag \pm SEM formában fejeztük ki, három tizedesjegyre megadva az eredményt a karnitinszterek esetében, tekintettel a hosszú szénláncú karnitinszterek alacsony koncentrációira. A szignifikancia határértéke 0,05 volt.

A genotípusok eloszlásának vizsgálatához χ^2 próbát alkalmaztunk.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata

A karnitin bioszintézis intermedierjei kontrollokban

A karnitin bioszintézis intermedierjeinek vizeletben történő kiválasztását vizsgáltuk egészséges kontrollokban. A metabolitok koncentrációinak meghatározását 2-66 év közötti 40 egészséges személy 24 órás vizeletéből végeztük. Az általunk vizsgált négy metabolit vizeletbeli koncentrációja az 11. táblázatban található, az eredmények egyezést mutatnak a korábban publikált adatokkal.

11. táblázat A karnitin bioszintézis metabolitjainak vizeletbeli koncentrációi egészséges kontrollokban

Vegyület	Átlag (SD) ^a , mmol/mol kreatinin	n	Referencia
TML	2,8 (0,8) [1,3-4,7]	40 ^b	Vaz et al., 2002a
	3,4	3	(Lange et al., 1973)
	4,3	25	(Lower et al., 1972)
	5,3 (1,7) [3,8-10,4]	13	(Kakimoto et al., 1970)
	4,7 (0,9) [3,5-6,2]	7	(Lehman et al., 1987)
	6,2 (0,3)	16	(Rebouche et al., 1989)
HTML	0,45 (0,15) [0,13-0,91]	40	Vaz et al., 2002a
γ-BB	0,27 (0,21) [0,05-0,79]	40	Vaz et al., 2002a
karnitin	15 (12) [1,6-48]	40	Vaz et al., 2002a
	16 (11)	28	(Krahenbuhl et al., 1997)
	18 (12)	5	(Olson et al., 1987)

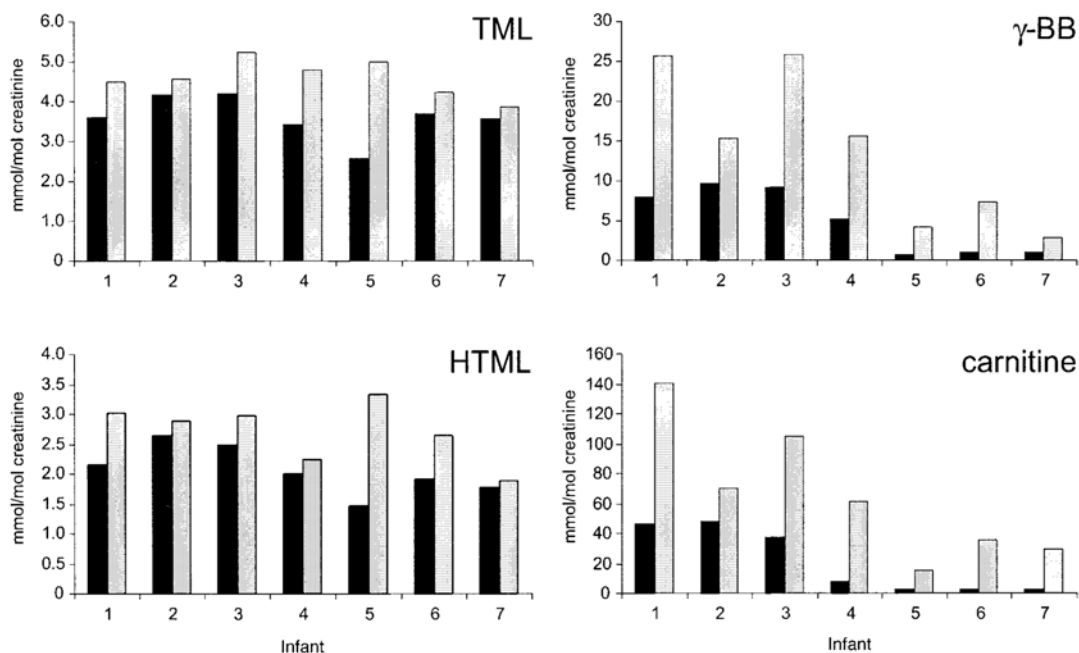
^aahol lehetséges, a tartomány szögletes zárójelben van megadva

^ba vizsgált csoport 23 férfi és 17 nő, átlag életkor 21 év (tartomány: 2-66 év)

A karnitin bioszintézis vizsgálata újszülöttekben

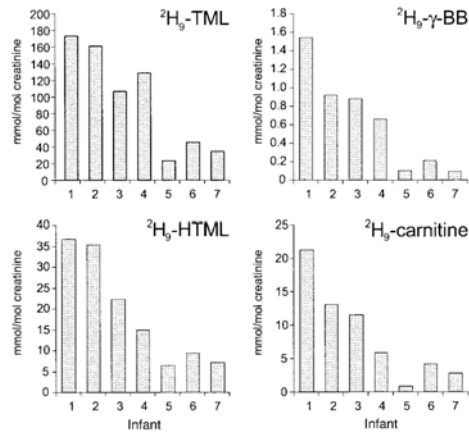
A 8. és 9. ábra az endogén és a ²H₉-jelölt TML, HTML, γ-BB és karnitin vizeletbeli koncentrációját mutatja a [²H₉]-TML beadása előtt és után. A beadás előtt és után is a TML és a HTML endogén koncentrációja arányosnak mutatkozott a kreatininnel. A [²H₉]-TML beadását követően az endogén TML és HTML átlag koncentrációja mérsékelten, de szignifikáns mértékben (P<0,001) emelkedett. Az endogén γ-BB koncentrációja a [²H₉]-TML beadását megelőzően nagy különbségeket mutatott, értéke 0,7 és 9,7 mmol/mol kreatinin között változott. A [²H₉]-TML beadását követően a γ-BB kiválasztása jelentősen megemelkedett, az eredeti koncentráció 1,5-től akár 6,7-szeresére (8. ábra). A karnitin koncentráció hasonlóan

viselkedett, értéke a $[^2\text{H}_9]$ -TML beadását megelőzően 2,5 és 48 mmol/mol kreatinin között változott és a $[^2\text{H}_9]$ -TML beadását követően 1,5-től a 12-szeresére emelkedett (8. ábra). A $[^2\text{H}_9]$ -TML beadása után kapott vizeletminták mindegyike tartalmazott $[^2\text{H}_9]$ -TML-t, $[^2\text{H}_9]$ -HTML-t, $[^2\text{H}_9]$ - γ -BB-t és $[^2\text{H}_9]$ -karnitint, ami azt mutatja, hogy az újszülöttek képesek karnitint szintetizálni. A $[^2\text{H}_9]$ -TMABA a detektálási határ alatt volt ezekben a vizelet mintákban.



8. ábra Az endogén karnitin bioszintézis metabolitjainak (kivéve a TMABA-t) vizeletbeli koncentrációi hét újszülöttben $[^2\text{H}_9]$ -TML beadása előtt (fekete oszlop) és után (szürke oszlop).

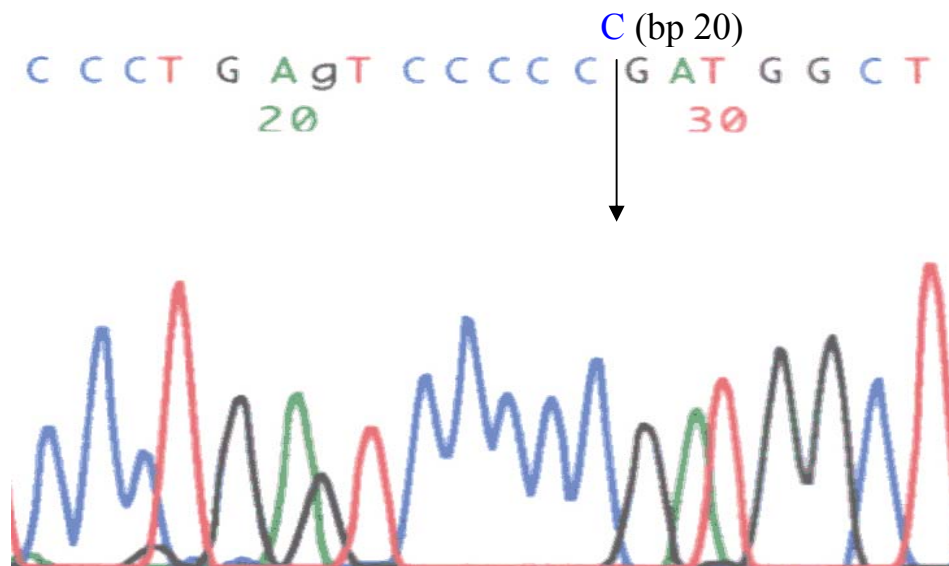
Mind a hét érett újszülött esetén a karnitin bioszintézis útvonal egy vagy több enzimatis lépésének termékei az összes kiürült $[^2\text{H}_9]$ -jelölt vegyületnek a 23 %-át (SD, 4 %) teszi ki és a szabad karnitin 10 %-a volt (SD, 3 %) $^2\text{H}_9$ -jelölt karnitin formájában a vizeletben (tartomány 5-16 %). A vizelet mintákban mért endogén és $^2\text{H}_9$ -jelölt karnitin koncentrációk (az eredmények nincsenek feltüntetve) egyezést mutattak az acilkarnitinek analizésére beállított tandem MS módszerrel kapott eredményekkel (Millington et al., 1990; Vreken et al., 1999). Az acilkarnitin analizés a legtöbb mintában acetyl- $[^2\text{H}_9]$ -karnitint, propionil- $[^2\text{H}_9]$ -karnitint és butiril- $[^2\text{H}_9]$ -karnitint mutatott ki a $[^2\text{H}_9]$ -TML beadását követően.



9. ábra A karnitin bioszintézis $^2\text{H}_9$ -jelölt metabolitjainak (kivéve a TMABA-t) vizeletbeli koncentrációi hét újszülöttnél $^2\text{H}_9$ -TML beadása után.

5.2. Primer karnitinhiányos betegek molekuláris genetikai vizsgálata

A molekuláris genetikai vizsgálatok mindkét érintett gyermek (4. ábra III/7 és 5. ábra II/3) esetében az SLC22A5 gén 5. exonjában egy citozin bázisdeleciót (844 delC a cDNS szekvenciában és 17081 delC a genomális szekvenciában) mutatott ki



aminosav pozíció	282																295
normál szekvencia	GAG	TCC	CCC	CGA	TGG	CTC	ATC	TCT	CAG	GGA	CGA	TTT	GAA	GAG	GCA	GAG	GTG
aminosav pozíció	E	S	P	R	W	L	I	S	Q	G	R	F	E	E	A	E	V
a beteg szekvenciája	GAG	TCC	CCC	GAT	GGC	TCA	TCT	CTC	AGG	GAC	GAT	TTG	AAG	AGG	CAG	AGG	TGA
aminosav szekvencia	E	S	P	D	G	S	S	L	R	D	D	L	K	R	Q	R	•

10. ábra Az SLC22A5 gén 5. exonjának forward irányú szekvenálási (5'-3') képe homozigóta mutáció esetén. A képen nyíl jelzi a deletált C bázis helyét. Az OCTN2 fehérje aminosav szekvenciájában bekövetkezett változás az ábra alsó részében olvasható

homozigóta formában. A mutáció az olvasási keret eltolódását eredményezi, ami a fehérjeláncban a 295-ös aminosav pozícióban egy korai stop kodon kialakulásához vezet (10. ábra). A bázisdeléció mellett nem találtunk egyéb eltérést az SLC22A5 gén egyik exonjának a szekvenciájában sem az AB016625 szekvenciához, mint referencia szekvenciához képest.

Az első család esetén 24 családtagtól sikerült perifériás vérből DNS mintát nyerni, valamint a család két bölcsőhalálban elhunyt gyermekének paraffinba ágyazott szöveti metszeteiből kinyert DNS állt a rendelkezésünkre. A mutációanalízis, ami a 844delC mutáció keresésre irányult, a két bölcsőhalálban elhunyt gyermek esetén a mutáció homozigóta formában való meglétét igazolta, a családban ezenkívül további 12 hordozót sikerült azonosítani. A kapott eredményeket a családfán tüntettük fel (4. ábra).

A második család esetén a két szülőtől, a vizsgált gyermektől és a bölcsőhalálban elhunyt (II/1) gyermek tüdőszövetéből kinyert DNS molekuláris genetikai vizsgálatát végeztük el. Az általunk vizsgált gyermekben, valamint a bölcsőhalálban elhunyt testvére esetén a bázisdeléciót homozigóta formában detektáltuk, a szülők heterozigóta formában hordozzák a mutációt. Az eredmények a családfán találhatóak (5. ábra).

5.3. Leigh szindrómás beteg mitokondriális DNS-ének genetikai vizsgálata és szérumban karnitinszter profiljának meghatározása

A fiú gyermekben a molekuláris genetikai vizsgálat egy anyai ágon öröklhető 8993 T>C mutációt mutatott ki a mitokondriális DNS-ben heteroplazmiás formában (95 % mutáns forma a vázizomban és 88 % a vérsejtekben). Továbbá egy homoplazmiás 8860 A>G tranzíció (treonin → alanin csere) volt detektálható az ATPase 6-os génben mind a betegben és az anyában

A karnitin kezelés alatt a gyermek plazma karnitinszter profilja szemben a kezelés előtti normál mintázattal, szignifikáns emelkedést mutatott a szabad karnitin (117 $\mu\text{mol/l}$), butirilkarnitin (5,29 szemben a $0,35 \pm 0,20 \mu\text{mol/l}$ -al) és a hexanoilkarnitin (1,68 szemben a $0,08 \pm 0,04 \mu\text{mol/l}$ -al) koncentrációjában, az összes többi acilkarnitin koncentrációja normál maradt.

5.4. Karnitinészter profil vizsgálata coeliakiás betegekben

A fő klinikai és laboratóriumi paraméterek, köztük azok, amelyeket általában a coeliakia aktivitási markereinek tekintenek, a 12. táblázatban találhatóak. A diagnózis felállításakor a coeliakiás betegekben a plazma vas és Hb szintje, valamint az MCV és BMI értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a jelen vizsgálatkor illetve a kontrollokhoz viszonyítva.

A plazma karnitinészter profil értékei az 13. táblázatban találhatóak. A szabad karnitin plazma szintje nem különbözik a betegekben és a kontrollokban. Ezzel szemben egy jelentős csökkenést találtunk a betegek acetilkarnitin szintjében, mely a kontroll érték 46 %-ának felel meg. Továbbá szignifikáns csökkenést detektáltunk a betegek propionil- (61,5 %), butiril- (56,9 %), hexanoil- (75 %), oktanoil- (71,1 %), oktenoil- (52,1 %), dekanoil- (73,1 %), decenoil- (58,3 %), lauroil- (61,5 %), miristoil- (66,7 %), miristoleil- (62,5 %) és oleil-karnitin (81,1 %) szintjében a kontrollokhoz képest (a zárójelben a csökkenés mértéke van %-ban kifejezve a kontroll értékeket 100 %-nak véve).

Az egyes karnitinészterek csökkenésének eredményeként az összes (totál) karnitinészter plazma szintje alacsonyabb volt a CD betegekben, mint a kontrollokban ($6,087 \pm 0,571$ szemben a $12,166 \pm 0,978 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,001$). Az acetilkarnitin/összkarnitinészter arány 0,773 volt a betegekben és 0,841 a kontrollokban.

12. táblázat A coeliakiás betegek és a kontroll csoport fontosabb klinikai és laboratóriumi paraméterei.

	Coeliakiás betegek n = 33		Kontroll n = 35
Nő/férfi	24 / 9		13 / 22
	<i>diagnóziskor</i>	<i>jelenlegi vizsgálatkor</i>	
Életkor (év)	27,4 ± 3,0	32,2 ± 2,5	31,0 ± 1,9
Vas (μmol/l)	13,0 ± 1,5 *	17,6 ± 1,3#	23,1 ± 2,1
Hb (g/dl)	12,6 ± 0,4 *	13,9 ± 0,3#	15,8 ± 0,5
MCV (fl)	85,5 ± 1,7*	88,4 ± 1,0#	94,3 ± 2,7
RDW (%)	15,7 ± 0,6	14,4 ± 0,4	13,9 ± 0,5
BMI (kg/m ²)	20,0 ± 0,7*	22,8 ± 0,6	23,1 ± 1,1

*p < 0.05 ugyanahhoz a csoporthoz és a kontrollokhoz viszonyítva a vizsgálat idején

#p < 0.05 a kontrollokhoz viszonyítva

13. táblázat A plazma karnitinszter profilja coeliakiás betegekben és a kontrollokban (átlag \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$).

	BETEGEK n=33	KONTROLLOK n=35
Szabad karnitin (C0)	27,191 \pm 1,194	30,029 \pm 1,902
Rövid szénláncú acilkarnitinek		
Acetilkarnitin (C2)	4,703 \pm 0,205*	10,227 \pm 0,368
Propionilkarnitin (C3)	0,247 \pm 0,014*	0,400 \pm 0,021
Butiril-karnitin (C4)	0,152 \pm 0,011*	0,267 \pm 0,013
Izovalerilkarnitin (C5)	0,111 \pm 0,010	0,138 \pm 0,010
Tiglikarnitin (C5:1)	0,034 \pm 0,002	0,033 \pm 0,003
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoilkarnitin (C6)	0,060 \pm 0,004*	0,080 \pm 0,006
Oktanoilkarnitin (C8)	0,086 \pm 0,006*	0,121 \pm 0,009
Oktenoilkarnitin (C8:1)	0,037 \pm 0,003*	0,071 \pm 0,008
Dekanoilkarnitin (C10)	0,103 \pm 0,008*	0,141 \pm 0,009
Decenoilkarnitin (C10:1)	0,063 \pm 0,005*	0,108 \pm 0,010
Lauroilkarnitin (C12)	0,032 \pm 0,002*	0,052 \pm 0,004
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoilkarnitin (C14)	0,016 \pm 0,001*	0,024 \pm 0,001
Miristoleilkarnitin (C14:1)	0,025 \pm 0,002*	0,040 \pm 0,004
Palmitoilkarnitin (C16)	0,097 \pm 0,006	0,113 \pm 0,006
Palmitoleilkarnitin (C16:1)	0,037 \pm 0,003	0,032 \pm 0,002
Sztearoilkarnitin (C18)	0,076 \pm 0,004	0,080 \pm 0,004
Oleilkarnitin (C18:1)	0,137 \pm 0,007*	0,169 \pm 0,008
Hidroximiristoilkarnitin (C14OH)	0,007 \pm 0,001	0,005 \pm 0,001
Hidroxi-palmitoilkarnitin (C16OH)	0,022 \pm 0,001	0,023 \pm 0,002
Hidroxi-palmitoleilkarnitin (C16:1OH)	0,026 \pm 0,002	0,029 \pm 0,002
Hidroxi-oleilkarnitin (C18:1OH)	0,016 \pm 0,002	0,013 \pm 0,002

* $p < 0,01$

5.5. A Crohn betegségre hajlamosító CARD15 gén, valamint a karnitin transzporter gének (SLC22A4, SLC22A5) polimorfizmusainak vizsgálata

5.5.1. Gyermek Crohn betegekben

Az allélfrekvenciák értékei az 14. táblázatban találhatóak. A gyermek Crohnos betegek 52,6 %-a hordoz legalább 1 NOD2 mutációt, ezzel szemben a felnőtt betegeknek csak 34,5 %-a, a kontroll személyeknek pedig 14,3 %-a (gyermek betegek vs kontroll esetében a $P < 0,05$).

Míg a T allél frekvenciája, ami heterozigóta és homozigóta R702W mutációt eredményez, kb. 2-szeresére nőtt a felnőtt CD populációban (9,09 %) a kontrollhoz képest (4,08 %), addig a gyermek CD betegekben csak 2,63 % (14. táblázat, $P < 0,05$ a gyermek szuszeptibilitás és/vagy normál variánsokat hasonlítva a felnőtt betegek és a kontrollok azonos értékeihez). Ezzel szemben a C allél frekvenciája, mely a G908R variánst kódolja, nagyon emelkedett (18,4 %) a gyermek betegekben, míg csak 1,82 % a felnőtt CD betegekben és 1,02 % a kontrollokban ($P < 0,05$). A 1007finsC variáns esetében szignifikánsan megemelkedett előfordulást találtunk mind a gyermek (21,1 %), mind a felnőtt CD (11,8 %) betegekben a kontrollokhoz viszonyítva (3,06 %) ($P < 0,05$).

Nem találtunk szignifikáns különbséget az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C mutációk allélfrekvenciájában, sem a gyermek, sem a felnőtt CD populációban a kontrollok eredményeihez képest (14. táblázat).

14. táblázat NOD2/CARD15 és az OCTN transzporter gének allélfrekvenciáinak összehasonlítása gyermek és felnőtt Crohn betegekben, valamint a kontrollokban.

		BETEGEK Gyermek <i>n</i> =19 (%)	BETEGEK Felnőtt <i>n</i> =55 (%)	KONTROLLOK <i>n</i> =49 (%)
CARD15 genotípus				
R702W	CC	18 (94,7)	46 (83,6)	46 (93,9)
	CT	1 (5,3)	8 (14,6)	2 (4,1)
	TT	-	1 (1,8)	1 (2,0)
	T allél frekvencia	2,63 %	9,09 %	4,08 %
G908R	GG	14 (73,7)	53 (96,4)	48 (98,0)
	GC	3 (15,8)	2 (3,6)	1 (2,0)
	CC	2 (10,5)	-	-
	C allél frekvencia	18,4 %	1,82 %	1,02 %
1007finsC	--	13 (68,5)	44 (80,0)	46 (93,9)
	- insC	4 (21,0)	9 (16,4)	3 (6,1)
	insC insC	2 (10,5)	2 (3,6)	-
	Cins allél frekvencia	21,1 %	11,8 %	3,06 %
SLC22A4 genotípus				
C1672T	CC	4 (21,0)	18 (32,7)	12 (24,5)
	CT	11 (58,0)	30 (54,5)	25 (51,0)
	TT	4 (21,0)	7 (12,8)	12 (24,5)
	T allél frekvencia	50,0 %	40,0 %	50,0 %
SLC22A5 genotípus				
G-207C	GG	3 (15,8)	14 (25,5)	10 (20,4)
	GC	7 (36,8)	31 (56,4)	26 (53,1)
	CC	9 (47,4)	10 (18,1)	13 (26,5)
	C allél frekvencia	65,8 %	46,4 %	53,1 %

5.5.2. Felnőtt Crohn betegekből

Az allélfrekvenciák értékei az 15. táblázatban találhatóak. A Crohn betegek 32 %-a hordoz legalább 1 NOD2 mutációt, míg a kontrolloknak csak 12,8 %-a ($P < 0,005$). Az 1007finsC mutációt tekintve a betegek 17 %-a heterozigóta vagy homozigóta erre a mutációra, ezzel szemben a kontrolloknak csak 4,3 %-a ($P < 0,005$). Az R702W és a G908R mutációk esetén nagyobb előfordulási gyakoriságot figyeltünk meg a betegek körében a kontrollokhöz képest. Az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C mutációk allélfrekvenciáiban azonban nem találtunk különbséget a betegek és a kontrollok eredményei között (15. táblázat).

15. táblázat NOD2/CARD15 és az OCTN transzporter gén allélfrekvenciáinak összehasonlítása a Crohn betegekből és a kontrollokból.

		BETEGEK N=100	KONTROLLOK N=94
CARD15 genotípus			
R702W	CC	87 (87,0 %)	87 (92,6 %)
	CT	12 (12,0 %)	5 (5,3 %)
	TT	1 (1,0 %)	2 (2,1 %)
	T allél frekvencia	7,00 %	4,79 %
G908R	GG	94 (94,0 %)	93 (98,9 %)
	GC	6 (6,0 %)	1 (1,16 %)
	CC	-	-
	C allél frekvencia	3,00 %	0,53 %
1007finsC	--	83 (83,0 %)	90 (95,7 %)
	- insC	15 (15,0 %)	4 (4,3 %)
	insC insC	2 (2,0 %)	-
	Cins allél frekvencia	9,50 %	2,13 %
SLC22A4 genotípus			
C1672T	CC	37 (37,0 %)	28 (29,8 %)
	CT	54 (54,0 %)	45 (47,9 %)
	TT	9 (9,0 %)	21 (22,3 %)
	T allél frekvencia	36,0 %	46,3 %
SLC22A5 genotípus			
G-207C	GG	31 (31,0 %)	19 (20,2 %)
	GC	54 (54,0 %)	51 (54,3 %)
	CC	15 (15,0%)	24 (25,5 %)
	C allél frekvencia	42,0 %	52,7 %
	TC haplotípus	9 (9,0 %)	19 (20,2 %)

5.6. Karnitínészter profil és a karnitin transzporter gének SNP genotípusának vizsgálata felnőtt Crohn betegekben

A CD betegek plazma karnitínészter profilja a 16. táblázatban található. A szabad karnitin és az acetilkarnitin plazmaszintje nem különbözik a beteg és a kontroll csoportban. Ezzel szemben szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a betegek éhgyomri propionil-, butiril- és izovaleril-karnitin szintjében a kontrollokhoz képest. Nem találtunk szignifikáns különbséget a rövid szénláncú (C2-C5:1) karnitínészterek szintjében a CD-betegek ($17,301 \pm 0,155 \mu\text{mol/l}$) és az egészséges kontrollok ($16,966 \pm 0,146 \mu\text{mol/l}$) között.

16. táblázat A plazma karnitínészter profilja Crohn betegekben és a kontrollokban (átlag \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$).

	BETEGEK n=85	KONTROLLOK n=48
Szabad karnitin (C0)	$28,670 \pm 0,0529$	$30,639 \pm 0,927$
Rövid szénláncú acilkarnitinek		
Acetilkarnitin (C2)	$16,598 \pm 0,402$	$16,160 \pm 0,548$
Propionilkarnitin (C3)	$0,243 \pm 0,008^*$	$0,283 \pm 0,014$
Butirilkarnitin (C4)	$0,274 \pm 0,009^*$	$0,301 \pm 0,013$
Izovalerilkarnitin (C5)	$0,147 \pm 0,006^*$	$0,185 \pm 0,009$
Tiglikarnitin (C5:1)	$0,039 \pm 0,002$	$0,037 \pm 0,002$
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoilkarnitin (C6)	$0,103 \pm 0,004$	$0,092 \pm 0,004$
Oktanoilkarnitin (C8)	$0,155 \pm 0,007$	$0,144 \pm 0,009$
Oktenoilkarnitin (C8:1)	$0,086 \pm 0,006^*$	$0,069 \pm 0,005$
Dekanoilkarnitin (C10)	$0,160 \pm 0,008$	$0,152 \pm 0,009$
Decenoilkarnitin (C10:1)	$0,119 \pm 0,006$	$0,125 \pm 0,008$
Lauroilkarnitin (C12)	$0,049 \pm 0,003$	$0,045 \pm 0,003$
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoilkarnitin (C14)	$0,023 \pm 0,001$	$0,021 \pm 0,001$
Miristoleilkarnitin (C14:1)	$0,048 \pm 0,003^*$	$0,037 \pm 0,003$
Palmitoilkarnitin (C16)	$0,140 \pm 0,005^*$	$0,122 \pm 0,004$
Palmitoleilkarnitin (C16:1)	$0,048 \pm 0,002$	$0,043 \pm 0,003$
Sztearoililkarnitin (C18)	$0,082 \pm 0,003$	$0,077 \pm 0,004$
Oleilkarnitin (C18:1)	$0,172 \pm 0,006^*$	$0,156 \pm 0,008$
Hidroximiristoilkarnitin (C14OH)	$0,008 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$
Hidroxpalmitoilkarnitin (C16OH)	$0,033 \pm 0,002$	$0,033 \pm 0,002$
Hidroxpalmitoleilkarnitin (C16:1OH)	$0,038 \pm 0,001$	$0,037 \pm 0,002$
Hidroxiolilkarnitin (C18:1OH)	$0,020 \pm 0,001$	$0,016 \pm 0,001$

* $p < 0,05$

Az oktenoil-karnitin szintje alacsonyabb volt az egészséges személyekben, a közepes szénláncú (C6-C12) acilkarnitinek össz-szintje $0,672 \pm 0,007$ $\mu\text{mol/l}$ volt a CD-betegekben és $0,627 \pm 0,007$ $\mu\text{mol/l}$ a kontrollokban. A hosszú szénláncú acilkarnitin csoportban a mirisztoleil-, palmitoil- és az oleil-karnitin plazmaszintje szignifikánsan alacsonyabb volt az egészséges csoportban. A hosszú szénláncú C14-C18:1-OH karnitínészterek össz-szintje $0,612 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/l}$ volt a CD-betegekben és $0,547 \pm 0,005$ $\mu\text{mol/l}$ a kontrollokban.

Az összes karnitínészter szintje $47,255 \pm 0,236$ $\mu\text{mol/l}$ volt a CD-betegekben és $48,779 \pm 0,243$ $\mu\text{mol/l}$ a kontrollokban.

A betegek különböző SLC22A4 1672C és T genotípusainak plazma karnitínészter profilja a 17. táblázatban, míg az SLC22A5 -207G és C genotípusoké a

17. táblázat Különböző SLC22A4 C1672T genotípusú Crohn betegek plazma karnitínészter profiljának összehasonlítása (átlag \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$)

	BETEGEK CC n=33	BETEGEK CT n=44	BETEGEK TT n=8
Szabad karnitin (C0)	$29,750 \pm 0,884$	$27,773 \pm 0,654$	$29,037 \pm 2,257$
Rövid szénláncú acilkarnitinek			
Acetil-karnitin (C2)	$16,903 \pm 0,681$	$16,427 \pm 0,578$	$16,235 \pm 0,734$
Propionil-karnitin (C3)	$0,248 \pm 0,011$	$0,242 \pm 0,013$	$0,227 \pm 0,029$
Butiril-karnitin (C4)	$0,287 \pm 0,016$	$0,270 \pm 0,013$	$0,241 \pm 0,021$
Izovaleril-karnitin (C5)	$0,160 \pm 0,010$	$0,139 \pm 0,007$	$0,134 \pm 0,023$
Tiglik-karnitin (C5:1)	$0,036 \pm 0,002$	$0,041 \pm 0,003$	$0,042 \pm 0,007$
Közepes szénláncú acilkarnitinek			
Hexanoil-karnitin (C6)	$0,108 \pm 0,006$	$0,101 \pm 0,005$	$0,089 \pm 0,010$
Oktanoil-karnitin (C8)	$0,158 \pm 0,011$	$0,156 \pm 0,011$	$0,142 \pm 0,023$
Oktenoil-karnitin (C8:1)	$0,077 \pm 0,010$	$0,090 \pm 0,008$	$0,100 \pm 0,018$
Dekanoil-karnitin (C10)	$0,167 \pm 0,013$	$0,157 \pm 0,012$	$0,147 \pm 0,028$
Decenoil-karnitin (C10:1)	$0,122 \pm 0,011$	$0,120 \pm 0,008$	$0,099 \pm 0,016$
Lauroil-karnitin (C12)	$0,051 \pm 0,005$	$0,046 \pm 0,004$	$0,050 \pm 0,011$
Hosszú szénláncú acilkarnitinek			
Miristoil-karnitin (C14)	$0,025 \pm 0,002$	$0,023 \pm 0,002$	$0,022 \pm 0,003$
Miristoleil-karnitin (C14:1)	$0,049 \pm 0,005$	$0,047 \pm 0,003$	$0,046 \pm 0,010$
Palmitoil-karnitin (C16)	$0,144 \pm 0,007$	$0,135 \pm 0,007$	$0,154 \pm 0,019$
Palmitoleil-karnitin (C16:1)	$0,052 \pm 0,004$	$0,044 \pm 0,003$	$0,058 \pm 0,008$
Sztearoil-karnitin (C18)	$0,085 \pm 0,004$	$0,082 \pm 0,005$	$0,077 \pm 0,010$
Oleil-karnitin (C18:1)	$0,190 \pm 0,008$	$0,163 \pm 0,010$	$0,178 \pm 0,021$
Hidroximiristoil-karnitin (C14OH)	$0,008 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,001$	$0,009 \pm 0,002$
Hidroxpalmitoil-karnitin (C16OH)	$0,034 \pm 0,002$	$0,033 \pm 0,003$	$0,035 \pm 0,008$
Hidroxpalmitoleil-karnitin (C16:1OH)	$0,035 \pm 0,002$	$0,038 \pm 0,002$	$0,043 \pm 0,005$
Hidroxiolail-karnitin (C18:1OH)	$0,022 \pm 0,003$	$0,018 \pm 0,002$	$0,023 \pm 0,004$

18. táblázatban található. Habár egyes észterek (C4 és C5 karnitinek) változásában megfigyelhető volt egy kis eltérés, azonban statisztikailag detektálható különbségeket nem találtunk egyik karnitínészterre sem, egyik mutáció esetében sem, amikor a heterozigóta vagy a homozigóta CD populáció eredményét hasonlítottuk a vad típusú csoport eredményeihez. Az előzőekhez hasonlóan a TC haplotípus (19. táblázat) sem a betegekben, sem a kontrollokban (az eredmények nincsenek feltüntetve) nem módosítja a karnitínészter profilt.

18. táblázat Különböző SLC22A5 G-207C genotípusú Crohn betegek plazma karnitínészter profiljának összehasonlítása (átlag \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$)

	BETEGEK GG n=28	BETEGEK GC n=45	BETEGEK CC n=12
Szabad karnitin (C0)	29,835 \pm 0,972	27,686 \pm 0,613	29,559 \pm 1,834
Rövid szénláncú acilkarnitinek			
Acetil karnitin (C2)	16,297 \pm 0,677	16,406 \pm 0,522	17,929 \pm 1,335
Propionil karnitin (C3)	0,248 \pm 0,011	0,242 \pm 0,014	0,236 \pm 0,020
Butiril karnitin (C4)	0,292 \pm 0,017	0,264 \pm 0,013	0,267 \pm 0,020
Izovaleril karnitin (C5)	0,158 \pm 0,010	0,143 \pm 0,008	0,133 \pm 0,016
Tigilil karnitin (C5:1)	0,036 \pm 0,002	0,040 \pm 0,003	0,043 \pm 0,005
Közepes szénláncú acilkarnitinek			
Hexanoil karnitin (C6)	0,101 \pm 0,006	0,103 \pm 0,005	0,104 \pm 0,012
Oktanoil karnitin (C8)	0,146 \pm 0,010	0,162 \pm 0,011	0,153 \pm 0,021
Oktenoil karnitin (C8:1)	0,077 \pm 0,011	0,091 \pm 0,008	0,085 \pm 0,015
Dekanoil karnitin (C10)	0,153 \pm 0,012	0,165 \pm 0,013	0,156 \pm 0,022
Decenoil karnitin (C10:1)	0,114 \pm 0,011	0,123 \pm 0,009	0,111 \pm 0,014
Lauroil karnitin (C12)	0,046 \pm 0,004	0,050 \pm 0,004	0,048 \pm 0,007
Hosszú szénláncú acilkarnitinek			
Miristoil karnitin (C14)	0,024 \pm 0,002	0,024 \pm 0,002	0,022 \pm 0,002
Miristoleil karnitin (C14:1)	0,044 \pm 0,005	0,050 \pm 0,004	0,047 \pm 0,006
Palmitoil karnitin (C16)	0,143 \pm 0,009	0,139 \pm 0,007	0,140 \pm 0,014
Palmitoleil karnitin (C16:1)	0,050 \pm 0,004	0,046 \pm 0,003	0,055 \pm 0,006
Sztearoil karnitin (C18)	0,084 \pm 0,004	0,081 \pm 0,005	0,083 \pm 0,009
Oleil karnitin (C18:1)	0,190 \pm 0,009	0,157 \pm 0,008	0,209 \pm 0,026
Hidroximiristoil karnitin (C14OH)	0,007 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001	0,009 \pm 0,002
Hidroxipalmitoil karnitin (C16OH)	0,034 \pm 0,003	0,034 \pm 0,002	0,031 \pm 0,005
Hidroxipalmitoleil karnitin (C16:1OH)	0,035 \pm 0,002	0,037 \pm 0,002	0,046 \pm 0,005
Hidroxioleil karnitin (C18:1OH)	0,022 \pm 0,003	0,018 \pm 0,002	0,022 \pm 0,003

19. táblázat Különböző SLC22A4 C1672T és SLC22A5 G-207C genotípusú Crohn betegek plazma karnitínészter profiljának összehasonlítása (átlag ± SEM, µmol/l)

	BETEGEK TC haplotípussal n=8	BETEGEK egyéb haplotípussal n=77
Szabad karnitin (C0)	29,037 ± 2,257	28,632 ± 0,497
Rövid szénláncú acilkarnitinek		
Acetil-karnitin (C2)	16,235 ± 0,734	16,638 ± 0,404
Propionil-karnitin (C3)	0,227 ± 0,029	0,245 ± 0,008
Butiril-karnitin (C4)	0,241 ± 0,021	0,277 ± 0,009
Izovaleril-karnitin (C5)	0,134 ± 0,023	0,148 ± 0,006
Tiglikarnitin (C5:1)	0,042 ± 0,007	0,039 ± 0,002
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoil-karnitin (C6)	0,089 ± 0,010	0,104 ± 0,004
Oktanoil-karnitin (C8)	0,142 ± 0,023	0,157 ± 0,007
Oktenoil-karnitin (C8:1)	0,100 ± 0,018	0,084 ± 0,006
Dekanoil-karnitin (C10)	0,147 ± 0,028	0,161 ± 0,008
Decenoil-karnitin (C10:1)	0,099 ± 0,016	0,121 ± 0,006
Lauroil-karnitin (C12)	0,050 ± 0,011	0,048 ± 0,003
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoil-karnitin (C14)	0,022 ± 0,003	0,024 ± 0,001
Miristoleil-karnitin (C14:1)	0,046 ± 0,010	0,048 ± 0,003
Palmitoil-karnitin (C16)	0,154 ± 0,019	0,139 ± 0,005
Palmitoleil-karnitin (C16:1)	0,058 ± 0,008	0,047 ± 0,002
Sztearoil-karnitin (C18)	0,077 ± 0,010	0,083 ± 0,003
Oleil-karnitin (C18:1)	0,178 ± 0,021	0,175 ± 0,006
Hidroximiristoil-karnitin (C14OH)	0,009 ± 0,002	0,008 ± 0,001
Hidroxi-palmitoil-karnitin (C16OH)	0,035 ± 0,008	0,033 ± 0,002
Hidroxi-palmitoleil-karnitin (C16:1OH)	0,043 ± 0,005	0,037 ± 0,001
Hidroxi-oleil-karnitin (C18:1OH)	0,023 ± 0,004	0,019 ± 0,001

5.7. Karnitínészter profil vizsgálata colitis ulcerosás betegekben

A plazma karnitínészter profil eredménye a 20. táblázatban található. A szabad karnitin és az acetyl-karnitin plazma szintje nem különbözik a beteg és a kontroll csoportban. Ezzel szemben szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a betegek éhgyomri propionil-, butiril- és izovaleril-karnitínészter szintjében a kontrollokhoz képest. A rövid szénláncú karnitínészterek összszintje jelentősen alacsonyabb volt a CU betegekben ($9,855 \pm 0,094$ µmol/l), mint az egészséges kontrollokban ($11,003 \pm 0,100$ µmol/l, $P < 0,01$).

Az oktanoil- és dekanoil-karnitin szintje az egészséges kontrollokban szignifikánsan alacsonyabb volt. A közepes szénláncú karnitinek összszintje

nyilvánvalóan magasabb volt a betegekben ($0,629 \pm 0,007 \mu\text{mol/l}$), mint a kontrollokban ($0,548 \pm 0,007 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,01$).

A hosszú-szénláncú acilkarnitin csoportban a miristoil-, palmitoil-, palmitoleil- és oleilkarnitinek plazma szintje szignifikánsan csökkent volt az egészséges csoportban. A hosszú-szénláncú karnitinszterek összszintje a betegekben jelentősen nagyobb volt ($0,596 \pm 0,005 \mu\text{mol/l}$), mint a kontrollokban ($0,515 \pm 0,009 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,01$).

Továbbá az összkarnitinszter szint a betegekben szignifikánsan alacsonyabb volt ($11,080 \pm 0,035 \mu\text{mol/l}$) az egészséges kontrollokhoz viszonyítva ($12,066 \pm 0,037 \mu\text{mol/l}$, $P < 0,01$).

20. táblázat A plazma karnitinszter profilja colitis ulcerosás betegekben és a kontrollokban (átlag \pm SEM, $\mu\text{mol/l}$).

	BETEGEK n=44	KONTROLLOK n=44
Szabad karnitin (C0)	$31,595 \pm 1,454$	$31,431 \pm 1,042$
Rövid szénláncú acilkarnitinek		
Acetilkarnitin (C2)	$9,164 \pm 0,426$	$10,179 \pm 0,461$
Propionilkarnitin (C3)	$0,331 \pm 0,019^*$	$0,392 \pm 0,017$
Butirilkarnitin (C4)	$0,219 \pm 0,014^*$	$0,265 \pm 0,012$
Izovalerilkarnitin (C5)	$0,111 \pm 0,008^*$	$0,134 \pm 0,008$
Tiglikarnitin (C5:1)	$0,030 \pm 0,004$	$0,033 \pm 0,002$
Közepes szénláncú acilkarnitinek		
Hexanoilkarnitin (C6)	$0,071 \pm 0,006$	$0,081 \pm 0,005$
Oktanoilkarnitin (C8)	$0,147 \pm 0,009^*$	$0,114 \pm 0,008$
Oktenoilkarnitin (C8:1)	$0,064 \pm 0,005$	$0,062 \pm 0,007$
Dekanoilkarnitin (C10)	$0,180 \pm 0,012^*$	$0,137 \pm 0,008$
Decenoilkarnitin (C10:1)	$0,113 \pm 0,006$	$0,104 \pm 0,008$
Lauroilkarnitin (C12)	$0,054 \pm 0,003$	$0,050 \pm 0,003$
Hosszú szénláncú acilkarnitinek		
Miristoilkarnitin (C14)	$0,026 \pm 0,001$	$0,024 \pm 0,001$
Miristoleilkarnitin (C14:1)	$0,048 \pm 0,003^*$	$0,039 \pm 0,003$
Palmitoilkarnitin (C16)	$0,128 \pm 0,006^*$	$0,109 \pm 0,004$
Palmitoleilkarnitin (C16:1)	$0,042 \pm 0,003^*$	$0,031 \pm 0,002$
Sztearoilkarnitin (C18)	$0,085 \pm 0,003$	$0,079 \pm 0,003$
Oleilkarnitin (C18:1)	$0,183 \pm 0,007^*$	$0,163 \pm 0,007$
Hidroximiristoilkarnitin (C14OH)	$0,007 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,001$
Hidroxipalmitoilkarnitin (C16OH)	$0,026 \pm 0,002$	$0,023 \pm 0,001$
Hidroxipalmitoleilkarnitin (C16:1OH)	$0,033 \pm 0,002$	$0,029 \pm 0,002$
Hidroxioleilkarnitin (C18:1OH)	$0,018 \pm 0,002^*$	$0,012 \pm 0,001$

* $p < 0,05$

6. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

6.1. A karnitin bioszintézisének vizsgálata

6.1.1. A karnitin bioszintézise egészséges kontrollokban

A karnitin bioszintézis köztitermékeinek 40 kontroll személyben elvégzett analízise (11. táblázat) azt mutatta, hogy a TML kiürülése arányos a kreatinin kiürülésével. Ez megegyezik a „clearance” vizsgálatok során kapott korábbi eredményekkel, melyek azt mutatták, hogy a TML reabszorpciója nem következik be a vesében (Lange et al., 1973). HTML jelenlétét a vizeletben korábban még nem közölték. A HTML kiürülése a TML kiürüléséhez hasonló profilt mutat és arányos a kreatinin kiürülésével, ami azt feltételezi, hogy a HTML reabszorpciója a TML-hez hasonlóan nem következik be a vesében. A γ -BB vizeletbeli koncentrációja alacsony volt (0,3 mmol/mol kreatinin) összehasonlítva a korábban plazmában közölt koncentrációkkal [4,8 μ mol/l (Sandor et al., 1988) és 1,8 μ mol/l (Terada et al., 1999; Inoue et al., 1999)]. Ez talán magyarázható azzal, hogy emberben a vesében nagy a γ -BB hidroxiláz aktivitása, ami a γ -BB nagy részét karnitinné alakítja át. Továbbá a γ -BB hatékonyan reabszorbeálódik a renális tubulusokban az OCTN2 transzporter működésének köszönhetően, ami tovább csökkenti a γ -BB vizeletbe történő kiürülését.

6.1.2. A karnitin bioszintézise újszülöttekben

Egy korábbi tanulmányban FAB MS-sel nem tudtak koraszülött csecsemők vizeletében 1 nappal a [2 H $_9$]-TML beadása után jelölt karnitint detektálni (Melegh et al., 1999). Ezt a tanulmányt kibővítve, hasonló vizsgálatokat végeztünk 7 érett újszülöttel, akik 5 napig [2 H $_9$]-TML-t kaptak és a vizeletmintáikat az általunk újonnan kifejlesztett módszerrel analizáltuk. A [2 H $_9$]-TML beadását követően a [2 H $_9$]-TMABA-t kivéve a karnitin bioszintézis összes metabolitja detektálható volt a vizeletben [2 H $_9$]-jelölt formában. Továbbá a [2 H $_9$]-karnitin az acilkarnitinekbe is beépült. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a csecsemők képesek az exogén TML-t karnitin prekursorokká, karnitinné és karnitínészterekké átalakítani kis mértékben. A TML nagy része (>75 %) azonban változatlan formában kiürül a vizeletbe, megerősítve ezzel azt, hogy a csecsemők nem használják fel hatékonyan az

exogén TML-t a karnitin bioszintézis prekursoraként. Habár ez a TML terhelési teszt nagymértékben hozzájárul ahhoz, hogy megértsük a karnitin bioszintézisét, azt azonban meg kell jegyezni, hogy ezek a kísérletek figyelmen kívül hagyták a TML intracelluláris metabolizmusát. Olyan szövetek, mint a szív és az izom jellemzően szintetizálnak TML-t, azonban nem abszorbeálják készen a keringésből. Azt feltételezzük, hogy az intracellulárisan előállított TML butirobetainné alakul át azokban a szövetekben, ahonnan származik, majd a butirobetain kiürül a keringésbe és karnitinné alakul át azokban a szövetekben, melyek γ -BB hidroxilázt tartalmaznak. A TML-lel ellentétben a γ -BB azonnal abszorbeálódik a májban és karnitinné alakul át. Ezek a folyamatok fontosak lehetnek a karnitin bioszintézise számára.

A [$^2\text{H}_9$]-TML beadását követően az endogén γ -BB és karnitin koncentrációja jelentősen magasabb volt, mint a [$^2\text{H}_9$]-TML beadása előtt. Ezt a jelenséget Melegh és mtsai is megfigyelték (Melegh et al., 1999; Melegh et al., 1996). Korábbi tanulmányokban, melyekben jelöletlen prekursorokat alkalmaztak (Olson et al., 1987; Rebouche et al., 1989), a vizelet karnitin kiürülést használták fel a karnitin bioszintézis mértékének kiszámítására, feltételezve azt, hogy ez a karnitin az aktuális bioszintézis eredménye volt. Elsősorban a TML terhelési tesztek esetében szükséges lehet az eredmények újraértékelése és további kísérletek szükségesek stabil izotóppal jelölt karnitin prekursorokkal.

6.2. Primer karnitinhiányos betegek molekuláris genetikai vizsgálata

Két primer karnitinhiányos betegnek az OCTN2 karnitin transzportert kódoló SLC22A5 génjének molekuláris genetikai vizsgálata során egy citozin bázisdeléciót detektáltunk a gén 5. exonjában homozigóta formában, ami a cDNS szekvenciában a 844-es pozícióban, a genomiális szekvenciában a 17081-es pozícióban található. A mutáció az olvasási keret eltolódásához vezet és így a deléciós hely utáni 13. tripletben egy korai stop kodon keletkezik: R282D aminosavcserét, illetve V295X truncációt eredményezve a fehérjében. Az így létrejövő csonka OCTN2 fehérje a teljes 557 helyett csak 295 aminosavból áll. A kialakult mutáció blokkolja a VII-XII transzmembrán domáinek szintézisét, de nem érinti a feltételezett ATP/GTP kötőhely kódolását. A mutáció vagy egy instabil mRNS képződését eredményezi, vagy a szintetizált csonka fehérje gyorsan lebomlik vagy funkcióképtelenné válik

(Lamhonwah et al., 2002), s ezáltal egy szisztémás karnitinhiány kialakulásához vezet.

6.3. Leigh szindrómás beteg mitokondriális DNS-ének genetikai vizsgálata és szérum karnitinszter profiljának meghatározása

A szekunder karnitinhiányos állapot kialakulása számos folyamat, így a mitokondriális légzési lánc, ezen belül a mitokondriális ATPáz deficiencia következménye lehet. Az általunk vizsgált Leigh szindrómás betegben a plazma és az izom összkarnitin szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, míg a plazma acilkarnitin profilja normál volt. 12 éves korában 50 mg/kg dózissal elkezdett karnitin terápia látványos klinikai javulást hozott.

A karnitin kezelés alatt a beteg plazma karnitinszter profilja szemben a kezelés előtti normál mintázattal, szignifikáns emelkedést mutatott a szabad karnitin (117 $\mu\text{mol/l}$), butirilkarnitin (5,29 vs 0,35 \pm 0,20 $\mu\text{mol/l}$) és a hexanoilkarnitin (1,68 vs 0,08 \pm 0,04 $\mu\text{mol/l}$) koncentrációjában, az összes többi acilkarnitin koncentrációja normál maradt. Habár a rendellenes profil a rövid szénláncú (emelkedett butirilkarnitin) vagy a közepes szénláncú acil-KoA dehidrogenáz deficienciában (emelkedett hexanoilkarnitin) megfigyeltekre emlékeztet, a vizsgálat során kapott profil nem karakterisztikus egyik deficienciára sem, és a tapasztalt rendellenesség leginkább egy károsodott mitokondriális β -oxidációt tükröz, ami csak magas szabad karnitin koncentrációnál detektálható. Ez azt mutatja, hogy ebben a betegségben a karnitinszter profil a szervezet karnitin státuszától vagy a betegség aktuális metabolikus körülményeitől függően változik.

6.4. A karnitinszter profil vizsgálata coeliakiás betegekben

A karnitinszter profil tömegspektrometriás vizsgálata során jelentős csökkenést találtunk az acetilkarnitin és szignifikáns csökkenést 11 további karnitinszter koncentrációjában hosszú ideje gluténmentes diétán lévő coeliakiás betegek plazmájában. A betegeink vizsgálata során kapott karnitinszter profil mintázata eltér az éhgyomri (Costa et al., 1999) és bármilyen ismert metabolikus betegség esetében kapott mintázattól (Vreken et al., 1999; Chace et al., 2003; Schulze

et al., 2003). A coeliakiás betegek vizsgálata során megfigyelt változások károsodott karnitin homeosztázis vagy főként a zsírsav metabolizmusból származó acil csoportok megváltozott anyagcseréjének következménye, vagy a kettő kombinációjának lehet az eredménye.

A vékonybél nyálkahártyájának károsodása központi szerepet játszhat azokban az eseményekben, melyek a vizsgálat során tapasztalt változásokhoz vezetnek. A karnitin tartalék nagy része táplálékforrásból származik (Li et al., 1992; Baker et al., 1993), a felszívódás helye a vékonybélben van (Hamilton et al., 1986; McCloud et al., 1996). A vékonybél nyálkahártya sejtei aktívan részt vesznek a karnitin és a karnitínészterek anyagcseréjében (Hamilton et al., 1986; McCloud et al., 1996): különböző aciltranszferázokat (Bieber, 1988), az OCTN2 karnitin transzportert (Tamai et al., 1998) és az emlősökben jelenlévő karnitin bioszintézis első három enzimjét (Zaspel et al., 1980), nevezetesen a trimetillizin hidroxilázt (EC 1.14.11.8), a hidrox-trimetillizin aldolázt (EC 4.1.2.'X') és a trimetilamino-butiraldehid dehidrogenázt (EC 1.2.1.47) tartalmazzák. Másrészt a vékonybél nyálkahártyája részt vesz a trigliceridek abszorpciójában és komplex szerepet játszik a lipoproteinek, mint pl. a chylomicron, VLDL és HDL lipoproteinek és különböző apolipoproteinek (Green et al., 1981; Field et al., 1995; Cartwright et al., 1998; Raybould, 1999; Tso et al., 2004) anyagcseréjében. Már régóta ismeretes, hogy a nyálkahártya károsodása coeliakiában a zsírok rendellenes felszívódásához vezet (Green et al., 2003; Shamir, 2003). A betegség klasszikus formájában szenvedő kezeletlen betegeket esetleg félretáplálhatják, ami károsodott étrendi szubsztrát felhasználást okoz, ideértve a zsírok és lipoproteinek anyagcseréjének károsodását. Meg kell jegyezni, hogy a hosszú ideje tartó gluténmentes diéta a lipid metabolizmus számos paraméterének javulásához vezet (Capristo et al., 2000). Azonban a visszanyerés nem feltétlenül teljes a lipid anyagcsere számos metabolitja esetén (Mediene et al., 1995; Pillan et al., 1994).

Paradox módon, habár az ismeretünk egyre növekszik a különböző betegségek keringési karnitínészter profiljának jellegzetességeit tekintve, nagyon keveset tudunk a normál állapotban működő szabályozásról. A karnitint a máj bocsátja ki a keringésbe elsősorban acilkarnitin formában (Sandor et al., 1987), az aktuális észter mintázat a perifériás szövetek felvétel/kibocsátási tevékenységének az eredménye. A vizsgált betegeinkben a rövid- és közepes szénláncú karnitínészterek voltak érintve. A propionil-karnitint kivéve, ami a metionin, valin és izoleucin aminosavak

lebomlásából is származhat, ezen acil csoportok főként hosszabb szénláncú zsírsavak oxidációjának degradációs termékei (Costa et al., 1999), megváltozott észter profilt találtunk tünetmentes betegeinkben, ami valószínűleg a még mindig érintett zsírsav metabolizmust tükrözi.

A lipid és lipoprotein anyagcserét alaposan tanulmányozták coeliakiás betegeinkben, a karnitin homeosztázisát azonban alig vizsgálták. 1994-ben Lerner és mtsai (Lerner et al., 1993) gyermek coeliakiás betegek szérumának karnitin koncentrációit vizsgálták és azt találták, hogy a betegség aktív stádiumában lévő betegek össz szérum karnitin koncentrációja csökkent az egészséges kontrollokéhoz képest, míg változatlan maradt a gluténmentes diétán lévő (nem aktív stádiumban lévő) betegeinkben (Lerner et al., 1993). Az aktív betegségben a karnitin tartalékok csökkenése valószínűleg másodlagos a károsodott abszorpcióval kapcsolatban lévő nyálkahártya sérüléshez képest. Habár hasonló tanulmány felnőtt betegek esetében nem található az irodalomban, ezután az egyetlen gyermek tanulmány nyomán a karnitin deficiencia lehetséges kialakulása a kezeletlen coeliakiás betegeinkben széles körben elfogadott (Fitzgerald et al., 2003).

A saját betegeinkben az össz karnitínészter csökkenése a tartalékok kimerülését tükrözheti. Ismert, hogy még a szigorúan gluténmentes diétán lévő betegeinkben is a nyálkahártya felépülésének funkcionális korlátai lehetnek. Ez egyrészt a karnitin felszívódását befolyásolja, másrészt a trimetillizin – butirobetain átalakítását károsíthatja, mivel a karnitin bioszintézis első három enzime expresszálódik a nyálkahártyában (Zaspel et al., 1980). Az is ismeretes, hogy a trimetillizin hidroxiláz enzim Fe^{2+} iont igényel kofaktorként (Vaz et al., 2002b). A betegeink állapota javult a vas helyettesítő terápia hatására, azonban a plazma vas, Hb és MCV értékeik továbbra is alacsonyak maradtak. Ez a jelenség általános ebben a betegségben (Mody et al., 2003). A csökkent szöveti vastartalom elméletileg hatással lehet az enzimaktivitásra.

Az utóbbi időben egyre növekszik azon felismerések száma, melyek szerint a klasszikus, főként malabszorpciós szindrómával és „flat jejunal mucosa”-val jellemezhető coeliakia mellett a metabolikus eltérések széles spektruma is összefüggésben lehet elsődlegesen vagy másodlagosan a betegséggel (Hardoff et al., 1980; Rossi, 2004). Néhányan közülük teoretikusan korai indikátorai és hajlamosító faktorai lehetnek egy nagyobb CD populáción manifesztálódó klinikai tüneteknek. A zsírsavak oxidatív metabolizmusának gátlása, ami hipotóniával és hiporeflexiával járó

miopátiához, hipoglikémiához, kardiomiopátiához encephalopathiához és a normálistól eltérő májfunkcióhoz vezet, melyek a coeliakia ritka extraintesztinális manifesztációi közé tartoznak, a karnitin insufficiencia eredménye lehet (Hoppel, 2003). Az, hogy a karnitin kiegészítés ésszerű-e a betegség kezelésében más, a klinikai gyakorlatban (Abdulkarim et al., 2003) már rutinszerűen alkalmazott metabolikus táplálékhoz hasonlóan, még tisztázásra vár.

6.5. A Crohn betegségre hajlamosító CARD15 gén, valamint a karnitin transzporter gének (SLC22A4, SLC22A5) polimorfizmusainak vizsgálata gyermek és felnőtt betegpopulációban

A CARD15 gén Crohn betegséggel asszociálódó három leggyakoribb mutációjának hordozási arányát Crohn betegségben szenvedő gyermekek között Észak-Amerikában (Tomer et al., 2003) 31 %-nak, Németországban (Sun et al., 2003) 60 %-nak, izraeli zsidó betegekben (Weiss et al., 2004) 51,5 %-nak, míg egy olasz kutatás során (Ferraris et al., 2005) 40,7 %-nak találták. Két tanulmányban a citozin inzerció mutáció (3020insC) szignifikánsan gyakoribb volt a gyermek CD populációban (Sun et al., 2003; Kugathasan et al., 2004), míg a zsidó betegek körében a G908R „missense” mutáció volt a leggyakoribb variáns (Weiss et al., 2004; Wine et al., 2004). Felnőtt betegpopuláción végzett európai tanulmányokban a hordozási arányt 30-50 % közöttinek találták (Ahmad et al., 2002; Arnott et al., 2004; Brant et al., 2003; Lesage et al., 2002; Mendoza et al., 2003; Vermeire et al., 2002; Vind et al., 2005).

Míg számos tanulmányban összefüggést találtak a kaukázusi populációban a CARD15 gén három kódoló variánsa (R702W, G908R és 1007finsC) és a Crohn betegség között ugyan eltérő allélfrekvenciákkal (Tomer et al., 2003; Sun et al., 2003; Lesage et al., 2002), addig ezen mutációkat egyáltalán nem találták meg az ázsiai betegekben (Inoue et al., 2002; Leong et al., 2003). Amíg a három mutáció allélfrekvenciája majdnem azonos volt (8,3 %, 8,3 % és 7,4 %) az olasz gyermek betegekben (Ferraris et al., 2005), a G908R variáns volt a leggyakoribb a zsidó gyerekek körében (Weiss et al., 2004) és az 1007finsC mutáció volt a gyakoribb Németországban (Sun et al., 2003) és az USA-ban (Kugathasan et al., 2004). Három további tanulmányban azt tapasztalták, hogy a betegség korábban jelentkezik a CARD15 mutációk jelenlétében (Lesage et al., 2002; Brant et al., 2003; Ahmad et al.,

2002). Ezek a megfigyelések azt feltételezik, hogy a CARD15 mutációk gyakoribbak a gyermek Crohnos betegek között.

Meglepetésünkre az általunk vizsgált gyermek betegek között két mutáció is, a G908R és az 1007finsC, szignifikánsan gyakoribb volt a gyermek populációban. A G908R mutáció allélfrekvenciája 18,42 % volt a gyerekekben és 1,02 % a kontrollokban, míg az 1007finsC allélfrekvenciáját 21,05 %-nak találtuk a gyerekekben és 3,06 %-nak a kontrollokban. A felnőtt populáción elvégzett genotipizálás eredményei (az R702W, G908R és az 1007finsC mutációk allélfrekvenciái rendre 7,0 %, 3,0 % és 9,5 % a betegekben és 4,8 %, 0,5 % és 2,0 % a kontrollokban) összhangban állnak az európai CD populációban talált adatokkal (6,7-12,9 %, 3,3-6,1 % és 6,6-16 % a betegekben és 3,5-6,9 %, 0,6-3,0 % és 1,0-4,4 % a kontrollokban) és a Magyarországon korábban találtakkal (Buning et al., 2005; Lakatos et al., 2005; Lesage et al., 2002; Vermeire et al., 2002; Mendoza et al., 2003; Arnott et al., 2004).

Az OCTN1 és OCTN2 transzporter fehérjéken keresztül zajlik a karnitin és számos egyéb szerves kation transzportja (Wu et al., 1998; Wu et al., 2000; Tamai et al., 1998), és fontos szerepet játszanak az epithel sejtek energiaellátásában. Mostanában tisztázódott, hogy az OCTN1 az ergothioneint is transzportálja (Grundemann et al., 2005), és az affinitási paraméterek alapján szinte kétségtelen, hogy ennek a fehérjének a karnitin transzport funkciója csak másodlagos. Az SLC22A4 gén 9-es exonjának C1672T missense szubsztitúciója jelentős változást eredményez az OCTN1 transzporter aktivitásában, míg az SLC22A5 gén promoter régiójának G-207C transzverziója az OCTN2 promoter funkciójának károsodását okozza.

Az IBD5 régió, ami magában foglalja a citokin gén klasztert, és ezért egy vonzó célpontja az IBD vizsgálatoknak, öt génjének újraszekvenálása során Peltekova és mtsai (Peltekova et al., 2004) két új polimorfizmust azonosítottak az SLC22A4 és SLC22A5 génekben. Ez a két mutáció (SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C) egy kétallélos rizikó haplotípust képeznek (OCTN-TC), ami CD-vel asszociálódik és szignifikáns kölcsönhatást mutat a CD-vel asszociálódó CARD15 mutációkkal. Ezt a megfigyelést több kutatócsoport is megerősítette (Newmann et al., 2005; Torok et al., 2005; Noble et al., 2005), habár az IBD5 rizikó haplotípus hiányában két tanulmányban nem találtak asszociációt az OCTN1/2 és a CD között (Torok et al., 2005; Noble et al., 2005). Míg egy belga csoport (Vermeire et al., 2005) szerint az

OCTN nem játszik szerepet a CD szuszceptibilitásában, az SLC22A4 és SLC22A5 gének két funkcionális variánsa teljesen hiányzik a japán populációból (Yamazaki et al., 2004).

Vizsgálataink során sem a gyermek, sem a felnőtt populációban nem tudtuk detektálni sem az SLC22A4, sem az SLC22A5 szuszceptibilitás variáns, sem a TC haplotípus akkumulációját, eredményeink ezáltal nem támasztják alá ezen haplotípusok hajlamosító szerepét a CD kialakulásában.

6.6. Karnitinészter profil és a karnitin transzporter gének SNP genotípusának vizsgálata felnőtt Crohn betegekben

A karnitin elsődleges biokémiai funkciója az, hogy részt vesz a sejtek energiatermelésében (Bieber et al., 1988). Továbbá az észterképzésen keresztül elősegíti a rövid és hosszú szénláncú zsírsavak eltávolítását, melyek felhalmozódnak a mitokondriumban a normális és rendellenes metabolizmus eredményeként. A cirkuláló karnitinészter spektrum jelezni képes a rövid-, közepes- vagy hosszú szénláncú zsírsavak celluláris metabolizmusában bekövetkező változásokat (Rashed, 2001).

Nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre a Crohn betegség karnitin státuszát illetően; ezek a vizsgálatok a karnitin meghatározásának enzimatis radiokémiai területéről származnak. Ezt a módszert alkalmazva Demirkol és mtsai szignifikáns csökkenést találtak a szabad és összkarnitin koncentrációkban Crohn betegségben szenvedő gyermekekben. Egy másik tanulmányban drámaian lecsökkent szabad karnitint és szignifikánsan emelkedett hosszú és rövid szénláncú acilkarnitin koncentrációkat figyeltek meg, melyek egy nettó növekedést eredményeztek a összkarnitinben. Azonban ebben a tanulmányban különböző típusú gyulladásos betegségben szenvedő betegeket vizsgáltak többszörös trauma vagy fejsérülés után (Adlouni et al., 1988). Ezért ezek az adatok nem teljesen hasonlíthatók össze az általunk vizsgált, kevert CD populációban találtakkal. A vizsgálataink során kapott adatok a karnitinészterek komplex változását mutatják és a jelenlegi ismeretünk nem elegendő a feltárt megfigyelések teljes megértéséhez.

A proinflammatorikus citokinek fontos szerepet játszanak a CD patogenezisében. A Crohn betegek vékonybél nyálkahártyájában megemelkedett az NF- κ B aktiválódása, amely központi szerepet játszik az immun- és gyulladásos

válaszokban, és részt vesz a proinflammatorikus citokinek géntranszkripciójában (Schreiber et al., 1998). A butirát gátolja az NF- κ B transzkripció faktor transzlokációját a sejtmagba, ezáltal megakadályozza a proinflammatorikus gének aktivációját (Segain et al., 2000; Di Sabatino et al., 2005). Így az észlelt butirilkarnitin szint a gyulladási folyamatok kialakulásának egy eleme lehet, azonban más magyarázat sem zárható ki.

Az OCTN1 és az OCTN2 fontos szerepet játszanak a plazma karnitin felvételében, ezáltal szabályozzák a normál szövet/keringési karnitin egyensúlyt (Tamai et al., 1998, Wu et al., 1998; 2000). Az SLC22A4 gén 9-es exonjának C1672T missense szubsztitúcióját hordozó fibroblasztokban, mely mutáció jelentős változást eredményez az OCTN1 transzporter aktivitásában, és az SLC22A5 gén promoter régiójának G-207C transzverzióját hordozó fibroblasztokban, mely mutáció az OCTN2 promoter funkciójának károsodását okozza, a karnitin felvétel érintett volt, ami azt mutatja, hogy ezek a genetikai variációk funkcionális következményekkel lehetnek kapcsolatban (Peltekova et al., 2004). A közlemény alapján arra lehet következtetni, hogy ezek a gének szerepet játszanak a krónikus gyulladási betegségekben, továbbá a szerzők azt feltételezték, hogy ezek a génvariánsok oly módon okozhatnak betegséget, hogy károsítják az OCTN1 aktivitást vagy expressziót, és csökkentik a karnitin transzportját egy sejttípustól és betegségtől függő módon. Vizsgálataink során a betegek plazma karnitinszter profilját analizáltuk a különböző SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C genotípusok szerint. Meglepetésünkre a genotípus variációk nem voltak kapcsolatban megváltozott karnitinszter profillal, ezért kizárhatjuk a genotípus bármilyen nagyobb hatását a karnitinszter spektrumra.

6.7. A karnitinszter profil vizsgálata colitis ulcerosában

A karnitin az a molekula, amely az aktivált hosszú szénláncú zsírsavakat bejuttatja a mitokondriális mártixba, ahol azok β -oxidáció során lebomlanak. Ezzel a funkciójával az L-karnitin nélkülözhetetlen szerepet játszik az energia metabolizmusban (Bieber, 1988). Továbbá, a karnitin molekula képes észtert képezni számos endogén és exogén eredetű közepes- és rövidszénláncú zsírsavval is (Bieber, 1988; Melegh et al., 1987). A keringési karnitinszter spektrumában tükröződnek a rövid-, közepes- vagy hosszú szénláncú zsírsavak sejtszintű anyagcseréjében

bekövetkező változások. Ezért a karnitínészter összetételének monitorozása egy széles körben alkalmazható eszköz számos veleszületett anyagcsere betegség diagnosztizálásában. A karnitínészter spektrumok megváltozása ugyanis közvetve kapcsolatban áll a karnitin aciltranszferázokon keresztül zajló metabolit fluxus megváltozásával. A fluxus megváltozása különösen akkor jelentős, ha egy részfolyamat teljesen blokkolódik, például örökletes enzimhiány következtében.

A colitis ulcerosus betegek vizsgálata során szignifikáns csökkenést találtunk az éhgyomri propionil-, butiril- és izovalerilkarnitin észterek plazma szintjében, ami a rövid szénláncú zsírsavak karnitínésztereinek csökkenéséhez vezet. Bár a CU pathogenezise a mai napig nem ismert, egy széles körben elfogadott hipotézis szerint kulcsszerepe van annak, hogy a bélsejtek számára a rövid szénláncú zsírsavak hozzáférhetősége lecsökken. Normális körülmények között az SCFA-k gyorsan felszívódnak a vastagbélből, és mind a colonocitáknak, mind azoknak a szöveteknek, ahova eljutnak energiaforrásként szolgálnak. Ezen túlmenően befolyásolják a lipid anyagcserét, a vastagbél nyálkahártyájának véráramlását, az emésztőnedv kiválasztást (Cummings et al., 1995). Alapesetben a vastagbél distalis részének hámsejtjei számára a fő energiaforrás a rövid szénláncú zsírsavak anyagcseréjéből származik (Scheppach et al., 1997), márpedig a CU-ban ez a folyamat károsodott. A rövid szénláncú zsírsavak anyagcseréjén túlmenően a koenzim A észtereződés megváltozásáról is úgy számoltak be, mint a CU-val asszociált folyamatról (Ellestad-Sayed et al., 1976). A sejtekben a zsírsavak acil csoportja a koenzim A molekuláról a karnitin β -hidroxil csoportjára a rövid-, közepes- és a hosszú szénláncú karnitin aciltranszferázok segítségével kerülnek át (Bieber, 1988). Ezen események önmagukban vagy együttesen magyarázhatják a keringési rövid szénláncú zsírsavak karnitínésztereinek a csökkenését.

A keringési plazma karnitin profilt a kibocsátási és felvételi mechanizmusok egyensúlya határozza meg. A karnitint a máj bocsátja ki a keringésbe elsősorban acilkarnitin formában (Sandor et al., 1987), a máj kapuvénájában az észter arány viszonylag magas, az összes karnitin körülbelül fele észter formában van jelen. A perifériás vérben detektált aktuális észter mintázat a perifériás szövetek felvétel/kibocsátási tevékenységének az eredménye; a perifériás vénás vérben a karnitinnak sokkal kisebb hányada kb. 1/3-a, 1/4-e található észter formában. Míg a CU betegekben a rövid szénláncú zsírsavak karnitínésztereiben bekövetkezett

csökkenés talán magyarázható a fentebb említettekkel, a jelenlegi ismereteink alapján sokkal nehezebb megmagyarázni a közepes- és hosszú szénláncú észterekben bekövetkezett ellentétes változást a rendelkezésünkre álló limitált adatok miatt. Csak néhány tanulmány foglalkozik a zsírsavak metabolizmusában bekövetkező változással. Habár az adatok ellentmondóak, azonban feltételezik az LCFA metabolizmus részvételét a CU kialakulásában (Siguel et al., 1996; Esteve-Comas et al., 1992; Kinsella et al., 1990). Egyes részletkérdések még tisztázásra várnak, ezekhez további vizsgálatok szükségesek.

A CU-ban helyileg alkalmazott rövid szénláncú zsírsav kezelés pozitív eredményeit követően (Harig et al., 1989) Gasbarrini és mtsai propionil-L-karnitinnal történő rektális irrigációt tanulmányozták a CU betegekben. Az alkalmazott kezelést követően a klinikai kép és a vastagbél hisztológiai státuszának javulását észlelték. A jelen eredmények fényében lehetségesnek látszik, hogy a szövetek minden bizonnyal lecsökkent tartalékai pótolhatók a szer adásával és a pozitív kimenetel a sikeres helyettesítő terápia következménye lehet. Az, hogy a már ismert előnyös terápiás hatásai a speciális hosszú szénláncú zsírsavakat tartalmazó vagy azzal kiegészített diétának legalább részben a hasonló helyettesítő jelenségnek köszönhető, még tisztázásra szorul.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Érett újszülöttekben [²H₉]-jelölt TML adással a karnitin bioszintézis metabolitjainak vizsgálata során a TMABA kivételével az összes köztterméket detektáltuk a vizeletben, az alkalmazott [²H₉]-jelölt TML nagy része változatlan formában ürült ki a vizeletben. Az állatkísérletes modellekkel kapott eredményekkel szemben megfigyeléseink a szabad TML rendkívül gyenge karnitinképző sajátosságára utalnak.
2. Két primér karnitinhiányos betegnek az OCTN2 karnitin transzportert kódoló SLC22A5 génjének molekuláris genetikai vizsgálata során 844delC bázisdeléciót detektáltunk homozigóta formában. Ezt a mutációt elsőként azonosítottuk bölcsőhalál esetében.
3. Egy Leigh szindrómás betegben a molekuláris genetikai vizsgálataink során anyai ágon örökölhető heteroplasztikus 8993 T>C mutációt mutattunk ki a mitokondriális DNS-ben. Megfigyeltük, hogy a betegben a karnitin terápia bevezetése a klinikai tünetek drámai javulását eredményezte.
4. Hosszú ideje gluténmentes diétán lévő coeliakiás betegek karnitínészter profilját elsőként vizsgáltuk. A C2-, C3-, C4-, C6-, C8-, C8:1-, C10-, C10:1-, C12-, C14-, C14:1- és C18:1-karnitínészterek csökkenését tapasztaltuk, ami károsodott karnitin homeosztázis, vagy a zsírsav metabolizmusból származó acilcsoportok megváltozott anyagcseréjének a lehetséges következménye.
5. A CARD15 gén R702W, G908R és 1007finsC variánsainak, az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C SNP-k vizsgálata során a CARD15 variánsok akkumulációját figyeltük meg a Crohnos betegpopulációban, nem tudtuk azonban detektálni sem az SLC22A4, sem az SLC22A5 szuszceptibilitás variáns, sem pedig a TC haplotípus akkumulációját. Eredményeink ezáltal nem támasztják alá az SLC és az SLC TC haplotípusok hajlamosító szerepét a CD kialakulásában magyar betegekben.
6. Az SLC22A4 C1672T és az SLC22A5 G-207C SNP-k felnőtt Crohnos betegek karnitin státuszára gyakorolt esetleges hatásainak tanulmányozása során azt tapasztaltuk, hogy a genotípus variációk nem voltak kapcsolatban megváltozott karnitínészter profillal.
7. Elsőként vizsgáltuk a Colitis ulcerosában szenvedő betegek karnitin státuszát tömegspektrometriásan. Szignifikáns csökkenést találtunk az éhgyomri C3-, C4- és C5-karnitínészterek plazma szintjében, ami megváltozott anyagcserére utal.

8. IRODALOMJEGYZÉK

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Toth G, Morava E, **Bene J**, Selhorst JJ, Overmars H, Vreken P, Molnar J, Farkas V, Melegh B. Carnitine-responsive carnitine insufficiency in a case of mtDNA 8993T>C mutation associated Leigh syndrome. *J Inherit Metab Dis* 2001; 24:421-422.
IF:1,790

Vaz FM, Melegh B, **Bene J**, Cuebas D, Gage DA, Bootsma A, Vreken P, van Gennip AH, Bieber LL, Wanders RJ. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002a; 48:826-834.
IF:4,788

Melegh B, **Bene J**, Mogyorosy G, Havasi V, Komlosi K, Pajor L, Olah E, Kispal G, Sumegi B, Mehes K. Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: Sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. *Am J Med Genet A* 2004; 131:121-126.
IF:3,659

Bene J, Komlosi K, Gasztonyi B, Juhasz M, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profile in adult celiac disease patients maintained on long-term gluten free diet. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6671-6675.

Bene J, Komlosi K, Havasi V, Talian G, Gasztonyi B, Horvath K, Mozsik G, Hunyady B, Melegh B, Figler M. Changes of plasma fasting carnitine ester profile in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12:110-113.

Bene J, Magyar L, Talián G, Komlósi K, Gasztonyi B, Tari B, Várkonyi A, Mózsik G, Melegh B. Prevalence of SLC22A4, SLC22A5 and CARD15 gene mutations in Hungarian pediatric patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12:5550-5553.

Bene J, Komlosi K, Magyar L, Talian G, Horvath K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mozsik G, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease patients characterized for SLC22A4 C1672T and SLC22A5 G-207C genotypes. *Br J Nutr* 2007; 98:345-350.
IF: 2,708 (2006)

Egyéb közlemények

Bene J, Nadasi E, Kosztolanyi G, Mehes K, Melegh B. Congenital cataract as the first symptom of a neuromuscular disease caused by a novel single large-scale mitochondrial DNA deletion. *Eur J Hum Genet* 2003; 1:375-379.
IF:3,669

Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, **Bene J**, Havasi V, Komlosi K, Melegh B. Increased prevalence of platelet glycoprotein IIb/IIIa PLA2 allele in ischaemic stroke associated with large vessel pathology. *Thromb Res* 2003; 109:265-269.

IF:1,71

Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, **Bene J**, Melegh B. Evaluation of the modifying effects of unfavourable genotypes on classical clinical risk factors for ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74:1615-1620.

IF:3,035

Banyai K, Jakab F, Reuter G, **Bene J**, Uj M, Melegh B, Szucs G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Arch Virol* 2003; 148:2281-2291.

IF:1,876

Komlosi K, Havasi V, **Bene J**, Ghosh M, Szolnoki Z, Melegh G, Nagy A, Stankovics J, Csaszar A, Papp E, Gasztonyi B, Toth K, Mozsik G, Romics L, ten Cate H, Smits P, Mehes K, Kosztolanyi G, Melegh B. Search for factor V Arg306 Cambridge and Hong Kong mutations in mixed Hungarian population samples. *Acta Haematol* 2003; 110:220-222.

IF:1,874

Benedek O, **Bene J**, Melegh B, Emody L. Mapping of possible laminin binding sites of *Y. pestis* plasminogen activator (Pla) via phage display. *Adv Exp Med Biol* 2003; 529:101-104.

Szolnoki Z, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, **Bene J**, Melegh B. Specific APO E genotypes in combination with the ACE D/D or MTHFR 677TT mutation yield an independent genetic risk of leukoaraiosis. *Acta Neurol Scand* 2004; 109:222-227.

IF:1,712

Dr. Kárteszi Judit, Dr. Hollódy Katalin, **Bene Judit**, Dr. Morava Éva, Dr. Hadzsiev Kinga, Czakó Márta, Dr. Melegh Béla, Dr. Kosztolányi György. Az MECP2 gén mutációinak analízise direkt szekvenálással magyarországi Rett-szindrómás betegekben. *Orv Hetil* 2004; 145:909-911.

Dr. Molnár Gergő Attila, Dr. Wagner Zoltán, Dr. Wagner László, Dr. Melegh Béla, Dr. Kőszegi Tamás, Dr. Degrell Péter, **Bene Judit**, Dr. Tamaskó Mónika, Laczy Boglárka, Dr. Nagy Judit, Dr. Wittmann István. Az ACE gén polimorfizmusának befolyása a szénhidrát-anyagcserére, az oxidatív stresszre és a célszervkárosodásra 2-es típusú diabetesben. *Orv Hetil* 2004; 145:855-859.

Dr. Gombos Eszter, Dr. Rosdy Beáta, Dr. Scheuring Noémi, Dr. Lásztity Natália, Dr. Komlói Katalin, **Bene Judit**, Dr. Szabó Teréz, Pollreisz Ferenc, Dr. Vékey Károly, Dr. Melegh Béla, Dr. Czinner Antal. A metilmalonsav-acidaemiáról egy esetünk kapcsán. *Gyermekgyógyászat* 2004. 55. évf. 3. szám

Dr. Komlósi Katalin, **Bene Judit**, Dr. Havasi Viktória, Dr. Tihanyi Marianna, Dr. Herczegfalvi Ágnes, Dr. Móser Judit, Dr. Melegh Béla. A mitokondriális DNS A3243G mutációja egy magyar családban. *Orv Hetil* 2004; 145:1805-1809.

Banyai K, Gentsch JR, Schipp R, Jakab F, **Bene J**, Melegh B, Glass RI, Szucs G. Molecular epidemiology of human P[8],G9 rotaviruses in Hungary between 1998 and 2001. *J Med Microbiol* 2004; 53:791-801.

IF:2,484

Karteszi J, Hollody K, **Bene J**, Morava E, Hadzsiev K, Czako M, Melegh B, Teszas A, Kosztolanyi G. Mutation analysis of MECP2 and determination of the X-inactivation pattern in Hungarian Rett syndrome patients. *Am J Med Genet A* 2004; 131:106.

IF:3,659

Komlosi K, Havasi V, **Bene J**, Storcz J, Stankovics J, Mohay G, Weisenbach J, Kosztolanyi G, Melegh B. Increased Prevalence of Factor V Leiden Mutation in Premature but Not in Full-Term Infants with Grade I Intracranial Haemorrhage. *Biol Neonate* 2005; 87:56-59.

IF:1,360

Szolnoki Z, Havasi V, **Bene J**, Komlosi K, Szoke D, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Gati I, Wittman I, Melegh B. Endothelial nitric oxide synthase gene interactions and the risk of ischaemic stroke. *Acta Neurol Scand* 2005; 111:29-33.

IF:1,982

Bellyei S, Szigeti A, Boronkai A, Szabo Z, **Bene J**, Janaky T, Barna L, Sipos K, Minik O, Kravjak A, Ohmacht R, Melegh B, Zavodszky P, Than GN, Sumegi B, Bohn H, Than NG. Cloning, sequencing, structural and molecular biological characterization of placental protein 20 (PP20)/human thiamin pyrophosphokinase (hTPK). *Placenta* 2005; 26:34-46.

IF:2,883

Papp E, Havasi V, **Bene J**, Komlosi K, Czopf L, Magyar E, Feher C, Feher G, Horvath B, Marton Z, Alexy T, Habon T, Szabo L, Toth K, Melegh B. Glycoprotein IIIA gene (PIA) polymorphism and aspirin resistance: is there any correlation? *Ann Pharmacother* 2005; 39:1013-1018.

IF:1,837

Banyai K, Palya V, Benko M, **Bene J**, Havasi V, Melegh B, Szucs G. The Goose Reovirus Genome Segment Encoding the Minor Outer Capsid Protein, sigma1/sigmaC, is Bicistronic and Shares Structural Similarities with its Counterpart in Muscovy Duck Reovirus. *Virus Genes* 2005; 31:285-291.

IF:1,417

Nadasi E, **Bene J**, Havasi V, Komlosi K, Talian G, Melegh G, Papp E, Gasztonyi B, Szolnoki Z, Sandor J, Mozsik G, Toth K, Melegh B, Wittmann I. Detection of the Leu40Arg variant of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in subjects with thrombotic diseases. *Thromb Res* 2005; 116:479-482.

IF:2,012

Szolnoki Z, Havasi V, Talian G, **Bene J**, Komlosi K, Somogyvari F, Kondacs A, Szabo M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Lymphotoxin-alpha gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel-associated ischemic stroke. *J Mol Neurosci* 2005; 27:205-211.

IF:2,555

Szolnoki Z, Havasi V, Talián G, **Bene J**, Komlósi K, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Angiotensin II type-1 receptor A1166C polymorphism is associated with increased risk of ischemic stroke in hypertensive smokers. *J Mol Neurosci* 2006; 28:285-290.

IF:2,965

Havasi V, Komlósi K, **Bene J**, Melegh B. Increased prevalence of glycoprotein IIb/IIIa Leu33Pro polymorphism in term infants with grade I intracranial haemorrhage. *Neuropediatrics* 2006; 37:67-71.

IF:1,366

Havasi V, Szolnoki Z, Talián G, **Bene J**, Komlósi K, Maász A, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Apolipoprotein A5 gene promoter region T-1131C polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischemic stroke. *J Mol Neurosci* 2006; 29:177-183.

IF:2,965

Komlósi K, Havasi V, **Bene J**, Süle N, Pajor L, Nicolai R, Benatti P, Calvani M, Melegh B. Histopathologic abnormalities of the lymphoreticular tissues in organic cation transporter 2 deficiency: evidence for impaired B cell maturation. *J Pediatr* 2007; 150:109-111.

IF:3,991

Magyari L, **Bene J**, Komlósi K, Talián G, Faragó B, Csöngéi V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Lakner L, Varga M, Gasztonyi B, Melegh B. Prevalence of SLC22A4 1672T and SLC22A5 -207C combination defined TC haplotype in Hungarian ulcerative colitis patients. *Pathol Oncol Res* 2007; 13:53-56.

IF:1,241

Papp E, Havasi V, **Bene J**, Komlosi K, Talian G, Feher G, Horvath B, Szapary L, Toth K, Melegh B. Does glycoprotein IIIa gene (PI(A)) polymorphism influence clopidogrel resistance? : a study in older patients. *Drugs Aging* 2007; 24:345-350.

IF:2,200

Magyari L, Faragó B, **Bene J**, Horvatovich K, Lakner L, Varga M, Figler M, Gasztonyi B, Mózsik G, Melegh B. No association of the cytotoxic T-lymphocyte associated gene CTLA4 +49A/G polymorphisms with Crohn's disease and ulcerative colitis in Hungarian population samples. *World J Gastroenterol* 2007; 13:2205-2208.

Nadasi E, Gyurus P, Czakó M, **Bene J**, Kosztolányi S, Fazekas S, Dömösi P, Melegh B. Comparison of mtDNA haplogroups in Hungarians with four other European populations: a small incidence of descents with Asian origin. *Acta Biol Hung* 2007; 58:245-256.

IF:0,688

Komlósi K, Talián GC, Faragó B, Magyari L, Cserép V, Kovács B, **Bene J**, Havasi V, Kiss CG, Czirják L, Melegh B. No influence of *SLC22A4* C660T and *RUNX1* G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008; 26:61-66.

IF:2,189

Összesített impakt faktor: 64,615

Idézett irodalom

Abdulkarim AS, Murray JA. Review article: The diagnosis of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:987-995.

Adlouni HA, Katrib K, Ferard G. Changes in carnitine in polymorphonuclear leukocytes, mononuclear cells, and plasma from patients with inflammatory disorders. *Clin Chem* 1988; 34:40-43.

Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122:854-866.

Amat di San Filippo C, Longo N. Tyrosine residues affecting sodium stimulation of carnitine transport in the OCTN2 carnitine/organic cation transporter. *J Biol Chem* 2004; 279:7247-7253.

Amat di San Filippo C, Pasquali M, Longo N. Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Hum Mutat* 2006; 27:513-523.

Amodio P, Angeli P, Merkel C, Menon F, Gatta A. Plasma carnitine levels in liver cirrhosis: relationship with nutritional status and liver damage. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28:619-626.

Angelini C, Trevisan C, Isaya G, Pegolo G, Vergani L. Clinical varieties of carnitine and carnitine palmitoyltransferase deficiency. *Clin Biochem* 1987; 20:1-7.

Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004; 5: 417-425.

Arockia Rani PJ, Panneerselvam C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36:1713-1726.

Atar D, Spiess M, Mandinova A, Cierpka H, Noll G, Lüscher TF. Carnitine--from cellular mechanisms to potential clinical applications in heart disease. *Eur J Clin Invest* 1997; 27:973-976.

Baker H, Frank O, DeAngelis B, Baker ER. Absorption and excretion of L-carnitine during single or multiple dosings in humans. *Int J Vitam Nutr Res* 1993; 63:22-26.

Baldassano RN, Piccoli DA. Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:445-458.

Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem* 1988; 57:261-283.

Border JR, Burns GP, Rumph C, Schenk WG Jr. Carnitine levels in severe infection and starvation: a possible key to the prolonged catabolic state. *Surgery* 1970; 68:175-179.

Brant SR, Picco MF, Achkar JP, Bayless TM, Kane SV, Brzezinski A, Nouvet FJ, Bonen D, Karban A, Dassopoulos T, Karaliukas R, Beaty TH, Hanauer SB, Duerr RH, Cho JH. Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset, and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 281-289.

Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; 63:1420-1480.

Buning C, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Weltrich R, Bochow B, Genschel J, Schmidt H, Lochs H. NOD2/CARD15 gene polymorphism in patients with inflammatory bowel disease: is Hungary different? *World J Gastroenterol* 2005; 11: 407-411.

Burwinkel B, Kreuder J, Schweitzer S, Vorgerd M, Gempel K, Gerbitz KD, Kilimann MW. Carnitine transporter OCTN2 mutations in systemic primary carnitine deficiency: a novel Arg169Gln mutation and a recurrent Arg282ter mutation associated with an unconventional splicing abnormality. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:484-487.

Capristo E, Addolorato G, Mingrone G, De Gaetano A, Greco AV, Tataranni PA, Gasbarrini G. Changes in body composition, substrate oxidation, and resting metabolic rate in adult celiac disease patients after a 1-y gluten-free diet treatment. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:76-81.

Carter AL, Abney TO, Lapp DF. Biosynthesis and metabolism of carnitine. *J Child Neurol* 1995; 10 Suppl 2:S3-7.

Cartwright IJ, Higgins JA. Molecular and intracellular events in the assembly and secretion of chylomicrons by enterocytes. *Biochem Soc Trans* 1998; 26:211-216.

Cederbaum SD, Koo-McCoy S, Tein I, Hsu BY, Ganguly A, Vilain E, Dipple K, Cvitanovic-Sojat L, Stanley C. Carnitine membrane transporter deficiency: a long-term follow up and OCTN2 mutation in the first documented case of primary carnitine deficiency. *Mol Genet Metab* 2002; 77:195-201.

Cederblad G, Hermansson G, Ludvigsson J. Plasma and urine carnitine in children with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1982; 125:207-217.

Cederblad G. Effect of diet on plasma carnitine levels and urinary carnitine excretion in humans. *Am J Clin Nutr* 1987; 45:725-729.

Cederblad G, Lindstedt S. A method for the determination of carnitine in the picomole range. *Clin Chim Acta* 1972; 37:235-243.

Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem* 2003; 49:1797-1817.

Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:7502-7507.

Costa CC, de Almeida IT, Jakobs C, Poll-The BT, Duran M. Dynamic changes of plasma acylcarnitine levels induced by fasting and sunflower oil challenge test in children. *Pediatr Res* 1999; 46:440-444.

Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987; 28:1221-1227.

Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T (eds.). Physiological and clinical aspects of short chain fatty acids. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

Dalakas MC, Leon-Monzon ME, Bernardini I, Gahl WA, Jay CA. Zidovudine-induced mitochondrial myopathy is associated with muscle carnitine deficiency and lipid storage. *Ann Neurol* 1994; 35:482-487.

Davis AT, Ingalls ST, Hoppel CL. Determination of free trimethyllysine in plasma and tissue specimens by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984; 306:79-87.

DeVivo DC, Tein I. Primary and secondary disorders of carnitine metabolism. *Int Pediatr* 1990; 5:134-141.

Di Sabatino A, Morera R, Ciccocioppo R, Cazzola P, Gotti S, Tinozzi FP, Tinozzi S, Corazza GR. Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22:789-794.

Dobrowolski SF, McKinney JT, Amat di San Filippo C, Giak Sim K, Wilcken B, Longo N. Validation of dye-binding/high-resolution thermal denaturation for the identification of mutations in the SLC22A5 gene. *Hum Mutat* 2005; 25:306-313.

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1857-1862.

Duran M, Loof NE, Ketting D, Dorland L. Secondary carnitine deficiency. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28:359-363.

Ellestad- Sayed JJ, Nelson RA, Adson MA, Palmer WM, Soule EH. Pantothenic acid, coenzyme A and human ulcerative and granulomatous colitis. *Am J Clin Nutr* 1976; 29:1333-1338.

Englard S. Hydroxylation of gamma-butyrobetaine to carnitine in human and monkey tissues. *FEBS Lett* 1979; 102:297-300.

Erflle JD, Fisher LJ, Sauer F. Carnitine and acetylcarnitine in the milk of normal and ketotic cows. *J Dairy Sci* 1970; 53:486-489.

Esteve-Comas M, Ramirez M, Fernandez-Banares F, Abad-Lacruz A, Gil A, Cabre E, Gonzalez-Huix F, Moreno J, Humbert P, Guilera M. Plasma polyunsaturated fatty acid pattern in active inflammatory bowel disease. *Gut* 1992; 33:1365-1369.

Evangelidou A, Vlassopoulos D. Carnitine metabolism and deficit--when supplementation is necessary? *Curr Pharm Biotechnol* 2003; 4:211-219.

Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42:941-967.

Ferraris A, Knafelz D, Torres B, Fortina P, Castro M, Dallapiccola B. Analysis of CARD15 gene variants in Italian pediatric patients with inflammatory bowel diseases. *J Pediatr* 2005; 147:272-273.

Ferreira IM. Quantification of non-protein nitrogen components of infant formulae and follow-up milks: comparison with cows' and human milk. *Br J Nutr.* 2003; 90:127-133.

Field FJ, Mathur SN. Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Prog Lipid Res* 1995; 34:185-198.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205.

Fitzgerald JF, Troncone R, Roggero P, Pozzi E, Garavaglia B, Parini R, Carissimi E, Santus F, Piemontese P, Cataliotti E, Mosca F, Carnelli V. Clinical quiz. Secondary carnitine deficiency due to celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 36:636-646.

Garavaglia B, Uziel G, Dworzak F, Carrara F, DiDonato S. Primary carnitine deficiency: heterozygote and intrafamilial phenotypic variation. *Neurology* 1991; 41:1691-1693.

Gasbarrini G, Mingrone G, Giancaterini A, De Gaetano A, Scarfone A, Capristo E, Calvani M, Caso V, Greco AV. Effects of propionyl-L-carnitine topical irrigation in distal ulcerative colitis: a preliminary report. *Hepato-Gastroenterology* 2003; 50: 1385-1389.

Green PH, Glickman RM. Intestinal lipoprotein metabolism. *J Lipid Res* 1981; 22: 1153-1173.

Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003; 362:383-391.

Grundemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schomig E. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:5256-5261.

Hamilton JW, Li BU, Shug AL, Olsen WA. Carnitine transport in human intestinal biopsy specimens. Demonstration of an active transport system. *Gastroenterology* 1986; 91:10-16.

Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999; 64:808-816.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001; 357:1925-1928.

Hardoff D, Sharf B, Berger A. Myopathy as a presentation of coeliac disease. *Dev Med Child Neurol* 1980; 22:781-783.

Harig JM, Soergel KH, Komorowski RA, Wood CM. Treatment of diversion colitis with short-chain fatty acid irrigation. *N Engl J Med* 1989; 320:23-28.

Henry RJ. Non-protein nitrogenous constituents. In: Henry RJ, ed. Clinical chemistry, principles and techniques, New York: Harper & Row, Hoeber Medical Division. 1964.

Hoppel C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am J Kidney Dis* 2003; 41:S4-12.

Hulse JD, Ellis SR, Henderson LM. Carnitine biosynthesis. beta-Hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. *J Biol Chem* 1978; 253:1654-1659.

Hulse JD, Henderson LM. Carnitine biosynthesis. Purification of 4-N'-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from beef liver. *J Biol Chem* 1980; 255:1146-1151.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379:821-823.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603.

Inoue F, Terada N, Nakajima H, Okochi M, Kodo N, Kizaki Z, Kinugasa A, Sawada T. Effect of sports activity on carnitine metabolism. Measurement of free carnitine, gamma-butyrobetaine and acylcarnitines by tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 731:83-88.

Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Núñez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123:86-91.

Jakobs BS, Wanders RJ. Fatty acid beta-oxidation in peroxisomes and mitochondria: the first, unequivocal evidence for the involvement of carnitine in shuttling propionyl-CoA from peroxisomes to mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 213:1035-1041.

Karpati G, Carpenter S, Engel AG, Watters G, Allen J, Rothman S, Klassen G, Mamer OA. The syndrome of systemic carnitine deficiency. Clinical, morphologic, biochemical, and pathophysiologic features. *Neurology* 1975; 25:16-24.

Kaufman RA, Broquist HP. Biosynthesis of carnitine in *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 1977; 252:7437-7439.

Kerner J, Hoppel C. Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. *Annu Rev Nutr* 1998; 18:179-206.

Kinsella JE, Lokesh B, Broughton S, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition* 1990; 6:24-44.

Koizumi A, Nozaki J, Ohura T, Kayo T, Wada Y, Nezu J, Ohashi R, Tamai I, Shoji Y, Takada G, Kibira S, Matsuishi T, Tsuji A. Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2247-2254.

Korponay-Szabo IR, Kovacs JB, Czinner A, Goracz G, Vamos A, Szabo T. High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28:26-30.

Krahenbuhl S, Reichen J. Carnitine metabolism in patients with chronic liver disease. *Hepatology* 1997; 25:148-153.

Kugathasan S, Collins N, Maresso K, Hoffmann RG, Stephens M, Werlin SL, Rudolph C, Broeckel U. CARD15 gene mutations and risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:1003-1009.

Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, Balogh M, Szipocs I, Kamaras G, Lakatos PL. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977-2001. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 404-409.

Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P; Hungarian IBD Study Group. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1489-1495.

Lamhonwah AM, Olpin SE, Pollitt RJ, Vianey-Saban C, Divry P, Guffon N, Besley GT, Onizuka R, De Meirleir LJ, Cvitanovic-Sojat L, Baric I, Dionisi-Vici C, Fumic K, Maradin M, Tein I. Novel OCTN2 mutations: no genotype-phenotype correlations: early carnitine therapy prevents cardiomyopathy. *Am J Med Genet* 2002; 111:271-284.

Lange HW, Löwer R, Hempel K. Quantitative determination of N epsilon-methylated lysines in human plasma and urine. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1973; 354:117-120.

Lehman LJ, Olson AL, Rebouche CJ. Measurement of epsilon-N-trimethyllysine in human blood plasma and urine. *Anal Biochem* 1987; 162:137-142.

Lennon DL, Shrago ER, Madden M, Nagle FJ, Hanson P. Dietary carnitine intake related to skeletal muscle and plasma carnitine concentrations in adult men and women. *Am J Clin Nutr* 1986; 43:234-238.

Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:1465-1470.

Lerner A, Gruener N, Iancu TC. Serum carnitine concentrations in coeliac disease. *Gut* 1993; 34:933-935.

Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamailard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70:845-857.

Li B, Lloyd ML, Gudjonsson H, Shug AL, Olsen WA. The effect of enteral carnitine administration in humans. *Am J Clin Nutr* 1992; 55:838-845.

Lindstedt G, Lindstedt S. Cofactor requirements of gamma-butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *J Biol Chem* 1970; 245:4178-4186.

Lombard KA, Olson AL, Nelson SE, Rebouche CJ. Carnitine status of lactoovo vegetarians and strict vegetarian adults and children. *Am J Clin Nutr* 1989; 50:301-306.

Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 142:77-85.

Lower R, Lange HW, Hempel K. N-ε-methylierte lysine: abbau und ausscheidung. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1972; 353:1545-1546.

Makhseed N, Vallance HD, Potter M, Waters PJ, Wong LT, Lillquist Y, Pasquali M, Amat di San Filippo C, Longo N. Carnitine transporter defect due to a novel mutation in the SLC22A5 gene presenting with peripheral neuropathy. *J Inherit Metab Dis* 2004; 27:778-780.

Maki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997; 349:1755-1759.

Marzo A, Cardace G, Corbelletta C, Pace S, D'Iddio S, Verrotti C, Cavatorta E, Grignaffini A. Plasma concentration, urinary excretion and renal clearance of L-carnitine during pregnancy: a reversible secondary L-carnitine deficiency. *Gynecol Endocrinol* 1994; 8:115-120.

Mayatepek E, Nezu J, Tamai I, Oku A, Katsura M, Shimane M, Tsuji A. Two novel missense mutations of the OCTN2 gene (W283R and V446F) in a patient with primary systemic carnitine deficiency. *Hum Mutat* 2000; 15:118.

McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* 1997; 244:1-14.

McCloud E, Ma TY, Grant KE, Mathis RK, Said HM. Uptake of L-carnitine by a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Gastroenterology* 1996; 111:1534-1540.

Mediene S, Hakem S, Bard JM, Medjaoui I, Benhamamouch S, Lebel P, Fruchart JC, Clavey V. Serum lipoprotein profile in Algerian patients with celiac disease. *Clin Chim Acta* 1995; 235:189-196.

Melegh B, Kerner J, Bieber LL. Pivampicillin-promoted excretion of pivaloylcarnitine in humans. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:3405-3409.

Melegh B, Kerner J, Jaszai V, Bieber LL. Differential excretion of xenobiotic acyl-esters of carnitine due to administration of pivampicillin and valproate. *Biochem Med Metab Biol* 1990; 43:30-38.

Melegh B, Hermann R, Bock I. Generation of hydroxytrimethyllysine from trimethyllysine limits the carnitine biosynthesis in premature infants. *Acta Paediatr* 1996; 85:345-350.

Melegh B, Tóth G, Adamovich K, Szekely G, Gage DA, Bieber LL. Labeled trimethyllysine load depletes unlabeled carnitine in premature infants without evidence of incorporation. *Biol Neonate* 1999; 76:19-25.

Melegh B. A humán OCTN2 karnitrintranszporter és mutációi. *Orv Hetil* 2004; 145:679-686.

Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, Peña AS, Lana R, Urcelay E, Cruz-Santamaría DM, de la Concha EG, Díaz-Rubio M, García-Paredes J. Prevalence of

mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38:1235-1240.

Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13:321-324.

Mody RJ, Brown PI, Wechsler DS. Refractory iron deficiency anemia as the primary clinical manifestation of celiac disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25:169-172.

Newman B, Gu X, Wintle R, Cescon D, Yazdanpanah M, Liu X, Peltekova V, Van Oene M, Amos CI, Siminovitch KA. A risk haplotype in the Solute Carrier Family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 128:260-269.

Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, Tsuji A. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* 1999; 21:91-94.

Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Ho GT, Tenesa A, Smith L, Anderson N, Arnott ID, Satsangi J. The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2005; 129:1854-1864.

Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11:1185-1194.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-606.

Oliva-Hemker M, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8:112-128.

Olson AL, Rebouche CJ. gamma-Butyrobetaine hydroxylase activity is not rate limiting for carnitine biosynthesis in the human infant. *J Nutr* 1987; 117:1024-1031.

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sørensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991; 324:84-88.

Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:1075-1081.

Panter RA, Mudd JB. Carnitine levels in some higher plants. *FEBS Lett* 1969; 5:169-170.

- Parnell ND, Ciclitira PJ. Review article: coeliac disease and its management. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13:1-13.
- Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36:471-475.
- Pillan MN, Spandrio S, Sleiman I, Meini A, Scalvini T, Balestrieri GP. Effects of a gluten-free diet on serum lipids and lipoprotein (a) levels in a group of patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18:183-185.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347:417-428.
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease (first part). *N Engl J Med* 1991; 325:928-935.
- Pons R, De Vivo DC. Primary and secondary carnitine deficiency syndromes. *J Child Neurol* 1995; 10:S8-24.
- Rahbeeni Z, Vaz FM, Al-Hussein K, Bucknall MP, Ruitter J, Wanders RJ, Rashed MS. Identification of two novel mutations in OCTN2 from two Saudi patients with systemic carnitine deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25:363-369.
- Ramsay RR, Gandour RD, van der Leij FR. Molecular enzymology of carnitine transfer and transport. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1546:21-43.
- Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 758:27-48.
- Raybould HE. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1999; 277:G751-G755.
- Rebouche CJ, Engel AG. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. *Biochim Biophys Acta* 1980; 630:22-29.
- Rebouche CJ. Synthesis of carnitine precursors and related compounds. *Methods Enzymol* 1986; 123:290-297.
- Rebouche CJ, Bosch EP, Chenard CA, Schabold KJ, Nelson SE. Utilization of dietary precursors for carnitine synthesis in human adults. *J Nutr* 1989; 119:1907-1913.
- Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J* 1992; 6:3379-3386.
- Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998; 18:39-61.

Reda E, D'Iddio S, Nicolai R, Benatti P, Calvani M. The carnitine system and body composition. *Acta Diabetol* 2003; 40 Suppl 1:S106-S113.

Reddi AS, Moquete M, Keshav G, DeAngelis B, Frank O, Baker H. Plasma carnitine levels in patients undergoing hemodialysis. *Nephron* 1998; 80:87-88.

Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000; 66:1863-1870.

Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001; 29:223-228.

Riva R, Albani F, Gobbi G, Santucci M, Baruzzi A. Carnitine disposition before and during valproate therapy in patients with epilepsy. *Epilepsia* 1993; 34:184-187.

Roediger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet* 1980; 712-715.

Roediger WE, Heyworth M, Willoghby P, Piris J, Moore A, Truelove SC. Luminal ions and short fatty acids as markers of functional activity of colon in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* 1982; 35:323-326.

Rossi T. Celiac disease. *Adolesc Med Clin* 2004; 15:91-103.

Rubio JC, de Bustos F, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Benito-León J, Martín MA, Campos Y, Ortí-Pareja M, Cabrera-Valdivia F, Arenas J. Cerebrospinal fluid carnitine levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1998; 155:192-195.

Rudman D, Sewell CW, Ansley JD. Deficiency of carnitine in cachectic cirrhotic patients. *J Clin Invest* 1977; 60:716-723.

Sachan DS, Hoppel CL. Carnitine biosynthesis. Hydroxylation of N6-trimethyl-lysine to 3-hydroxy-N6-trimethyl-lysine. *Biochem J* 1980; 188:529-534.

Sachan DS, Broquist HP. Synthesis of carnitine from epsilon-N-trimethyllysine in post mitochondrial fractions of *Neurospora crassa*. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96:870-875.

Sahajwalla CG, Helton ED, Purich ED, Hoppel CL, Cabana BE. Multiple-dose pharmacokinetics and bioequivalence of L-carnitine 330-mg tablet versus 1-g chewable tablet versus enteral solution in healthy adult male volunteers. *J Pharm Sci* 1995; 84:627-633.

Sandor A, Kispal G, Melegh B, Alkonyi I. Ester composition of carnitine in the perfusate of liver and in the plasma of donor rats. *Eur J Biochem* 1987; 170:443-445.

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* 1988; 176:17-27.

Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996; 14:199-202.

Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H. Effect of butyrate enemas in the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1992; 103:51-56.

Scheppach W, Muller JG, Boxberger F, Dusel G, Richter F, Bartram HP, Christl SU, Dempfle CE, Kasper H. Histological changes in the colonic mucosa following irrigation with short-chain fatty acids. *Eur J Gastroentero Hepatol* 1997; 9:163-168.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42:477-484.

Schulze A, Lindner M, Kohlmuller D, Olgemoller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics* 2003; 111:1399-1406.

Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 2000; 47:397-403.

Shamir R. Advances in celiac disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2003; 32:931-947.

Shapira Y, Glick B, Harel S, Vattin JJ, Gutman A. Infantile idiopathic myopathic carnitine deficiency: treatment with L-carnitine. *Pediatr Neurol* 1993; 9:35-38.

Siguel EN, Lerman RH. Prevalence of essential fatty acid deficiency in patients with chronic gastrointestinal disorders. *Metabolism* 1996; 45:12-23.

Stanley CA. New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. *Adv Pediatr* 1987; 34:59-88.

Stanley CA, DeLeeuw S, Coates PM, Vianey-Liaud C, Divry P, Bonnefont JP, Saudubray JM, Haymond M, Trefz FK, Breningstall GN, et al. Chronic cardiomyopathy and weakness or acute coma in children with a defect in carnitine uptake. *Ann Neurol* 1991; 30:709-716.

- Steiber A, Kerner J, Hoppel CL. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Mol Aspects Med* 2004; 25:455-473.
- Stumpf DA, Parker WD Jr, Angelini C. Carnitine deficiency, organic acidemias, and Reye's syndrome. *Neurology* 1985; 35:1041-1045.
- Sun L, Roesler J, Rosen-Wolff A, Winkler U, Koch R, Thurigen A, Henker J. CARD15 genotype and phenotype analysis in 55 pediatric patients with Crohn disease from Saxony, Germany. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37:492-497.
- Tamai I, Ohashi R, Nezu J, Yabuuchi H, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity human carnitine transporter OCTN2. *J Biol Chem* 1998; 273:20378-20382.
- Tamamogullari N, Silig Y, İçagasioglu S, Atalay A. Carnitine deficiency in diabetes mellitus complications. *J Diabetes Complications* 1999; 13:251-253.
- Tang NL, Ganapathy V, Wu X, Hui J, Seth P, Yuen PM, Wanders RJ, Fok TF, Hjelm NM. Mutations of OCTN2, an organic cation/carnitine transporter, lead to deficient cellular carnitine uptake in primary carnitine deficiency. *Hum Mol Genet* 1999; 8:655-660.
- Tang NL, Hwu WL, Chan RT, Law LK, Fung LM, Zhang WM. A founder mutation (R254X) of SLC22A5 (OCTN2) in Chinese primary carnitine deficiency patients. *Hum Mutat* 2002; 20:232.
- Tein I, De Vivo DC, Bierman F, Pulver P, De Meirleir LJ, Cvitanovic-Sojat L, Pagon RA, Bertini E, Dionisi-Vici C, Servidei S, DiMauro S. Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. *Pediatr Res* 1990; 28:247-255.
- Terada N, Inoue F, Okochi M, Nakajima H, Kizaki Z, Kinugasa A, Sawada T. Measurement of carnitine precursors, epsilon-trimethyllysine and gamma-butyrobetaine in human serum by tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 731:89-95.
- Tomer G, Ceballos C, Concepcion E, Benkov KJ. NOD2/CARD15 variants are associated with lower weight at diagnosis in children with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2479-2484.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Muller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brunnler G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkuhn T, Folwaczny C. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 2005; 54:1421-1427.
- Tso P, Nauli A, Lo CM. Enterocyte fatty acid uptake and intestinal fatty acid-binding protein. *Biochem Soc Trans* 2004; 32:75-78.

Vaz FM, Scholte HR, Ruiter J, Husaarts-Odijk LM, Pereira RR, Schweitzer S, de Klerk JB, Waterham HR, Wanders RJ. Identification of two novel mutations in OCTN2 of three patients with systemic carnitine deficiency. *Hum Genet* 1999; 105:157-161.

Vaz FM, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 2002b; 361: 417-429.

Verhoeven NM, Roe DS, Kok RM, Wanders RJ, Jakobs C, Roe CR. Phytanic acid and pristanic acid are oxidized by sequential peroxisomal and mitochondrial reactions in cultured fibroblasts. *J Lipid Res* 1998; 39:66-74.

Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002; 71:74-83.

Vermeire S, Pierik M, Hlavaty T, Claessens G, van Schuerbeeck N, Joossens S, Ferrante M, Henckaerts L, Bueno de Mesquita M, Vlietinck R, Rutgeerts P. Association of organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology* 2005; 129:1845-1853.

Vind I, Vieira A, Hougs L, Tavares L, Riis L, Andersen PS, Loch H, Freitas J, Monteiro E, Christensen IJ, Munkholm P. NOD2/CARD15 gene polymorphisms in Crohn's disease: a genotype-phenotype analysis in Danish and Portuguese patients and controls. *Digestion* 2005; 72:156-163.

Vreken P, van Lint AE, Bootsma AH, Overmars H, Wanders RJ, Van Gennip AH. Quantitative plasma acylcarnitine analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidaemias and fatty acid oxidation defects. *J Inherit Metab Dis* 1999; 22:302-306.

Wang Y, Ye J, Ganapathy V, Longo N. Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:2356-2360.

Wang Y, Kelly MA, Cowan TM, Longo N. A missense mutation in the OCTN2 gene associated with residual carnitine transport activity. *Hum Mutat* 2000a; 15:238-245.

Wang Y, Taroni F, Garavaglia B, Longo N. Functional analysis of mutations in the OCTN2 transporter causing primary carnitine deficiency: lack of genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat* 2000b; 16:401-407.

Wang Y, Korman SH, Ye J, Gargus JJ, Gutman A, Taroni F, Garavaglia B, Longo N. Phenotype and genotype variation in primary carnitine deficiency. *Genet Med* 2001; 3:387-392.

Weiss B, Shamir R, Bujanover Y, Waterman M, Hartman C, Fradkin A, Berkowitz D, Weintraub I, Eliakim R, Karban A. NOD2/CARD15 mutation analysis and genotype-

phenotype correlation in Jewish pediatric patients compared with adults with Crohn's disease. *J Pediatr* 2004; 145:208-212.

Wilcken B, Wiley V, Sim KG, Carpenter K. Carnitine transporter defect diagnosed by newborn screening with electrospray tandem mass spectrometry. *J Pediatr* 2001; 138:581-584.

Wine E, Reif SS, Leshinsky-Silver E, Weiss B, Shaoul RR, Shamir R, Wasserman D, Lerner A, Boaz M, Levine A. Pediatric Crohn's disease and growth retardation: the role of genotype, phenotype, and disease severity. *Pediatrics* 2004; 114:1281-1286.

Wu X, Prasad PD, Leibach FH, Ganapathy V. cDNA sequence, transport function, and genomic organization of human OCTN2, a new member of the organic cation transporter family. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:589-595.

Wu X, George RL, Huang W, Wang H, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V. Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1466:315-327.

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y. Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet* 2004; 49:664-668.

Zaspel BJ, Sheridan KJ, Henderson LM. Transport and metabolism of carnitine precursors in various organs of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1980; 631:192-202.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Melegh Béla Professzor Úrnak, hogy több éven át tartó folyamatos ösztönzésének köszönhetően egyéni felkészülökként elkészíthettem doktori értekezésemet. Különösen szerencsésnek tartom magam, hogy a vezetése alatt inspiratív környezetben dolgozhattam és folyamatosan újabb és újabb kihívásokat jelentő és korszerű témákkal foglalkozhattam és elmélyülhettem a molekuláris genetika, majd a tömegspektrometria rejtelmeiben.

Köszönettel tartozom Dr. Kosztolányi György Professzor Úrnak, aki az Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet korábbi intézetvezetőjeként lehetővé tette számomra, hogy ezen a területen dolgozhassak és pályám kezdeti szakaszában bevezett a genetika alapjaiba.

Nagyon hálás vagyok az Orvosi Genetikai és Gyermekfejlődéstani Intézet minden munkatársának, akik rendkívül sok segítséget nyújtottak munkám kísérletes részében. Külön köszönöm Szántó Ferencnének és Hartung Mártának a felbecsülhetetlen hozzájárulásukat a tömegspektrometriás vizsgálatok kivitelezésében, Papp Editnek és Oksai Juditnak a genetikai vizsgálatokban nyújtott segítségüket.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Komlósi Katalinnak, Dr. Havasi Viktóriának és Talián Gábornak, hogy személyiségükkel és szaktudásukkal a mindennapi életet megkönnyítő baráti légkört teremtettek.

Több vizsgálat is más intézményekkel együtt kooperációban készült el. Ezekben belül külön köszönettel tartozom Dr. Figler Mária Professzor Asszonynak és Dr. Gasztonyi Beáta főorvos asszonynak a közlemények írásában és a minták gyűjtésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban végtelen hálával és köszönettel tartozom családomnak, akik a biztonságos és szeretetteljes családi háttér megteremtésével mindvégig mellettem álltak, bíztattak és támogattak férjemnek, Berente Zoltánnak és gyermekeimnek Tamásnak (3), Zsófinak (3) és Pannikának (1) a türelmüket, valamint szüleimnek, testvéremnek és a férjem szüleinek a gyerekek gondozásában nyújtott sok-sok segítséget és támogatást.