

**A karnitin-anyagcsere vizsgálata tandem tömegspektrometriával
terhességben, rheumatoid arthritis, szisztémás szklerózis és IBD
betegségekben**

Ph.D. értekezés tézisei

Talián Csaba Gábor

Program:	Multidiszciplináris Orvostudományok
Programvezető:	Dr. Sümegi Balázs
Alprogram B-449:	Humán molekuláris genetika
Programvezető és témavezető:	Dr. Melegh Béla

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Orvosi Genetikai és Gyermekejlődéstani Intézet

2009, Pécs

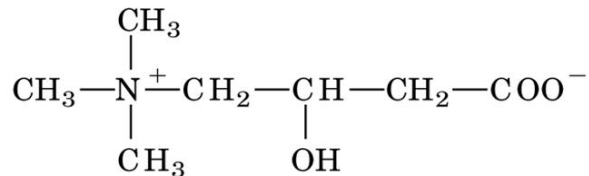
RÖVIDÍTÉSEK

CACT:	karnitin-acilkarnitin transzlokáz (carnitine-acylcarnitine translocase)
CAT:	karnitin-acetil transzferáz (carnitine acetyltransferase)
CD:	Crohn-betegség (Crohn's disease)
CID:	ütközés kiváltotta bomlás (collision induced decay)
COT:	karnitin-oktanoil transzferáz (carnitine octanoyltransferase)
CPT:	karnitin-palmitoil transzferáz (carnitine palmitoyltransferase)
ESI:	elektrospray ionizáció
HPLC:	nagynyomású folyadékkromatográfia (high-pressure liquid chromatography)
IBD:	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
LCAC:	hosszú szénláncú acilkarnitin (long-chain acylcarnitine)
MCAC:	közepes szénláncú acilkarnitin (medium-chain acylcarnitine)
OCTN:	szerves kation transzporter (organic cation transporter)
PS:	anyaion vagy prekursor ion pásztázás (parent scan)
RA:	reumás ízületi gyulladás (rheumatoid arthritis)
RFLP:	restriction fragment length polymorphism
SCAC:	rövid szénláncú acilkarnitin (short-chain acylcarnitine)
SNP:	single nucleotide polymorphism
SSc:	szisztémás szklerózis (systemic sclerosis)
UC:	colitis ulcerosa (ulcerative colitis)

Karnitínészterek jelölése: A karnitin-anyagcsere jellemzésekor a szabályos kémiai, illetve triviális nevek mellett vagy helyett gyakrabban az egyes észterek rövidített neveit használják. Itt „C” és egy szám jelenti a karnitinmolekulához kapcsolódó oldallánc szénatomszámát, kettőspont és szám a telítetlen kötések mennyiségét pozíciótól függetlenül, „DC” a kettős karbonsavakat (pl. glutársav), „OH” pedig a hidroxilációt. Pl. **C18:2-OH** 18 szénatomos, két kettős kötést tartalmazó és hidroxilált zsírsav oldalláncot jelent. A szabad karnitint **C0** jelöli.

1. BEVEZETÉS

Az eukarióta sejtekben az egyes szervecskék koenzimkészlete általában egymástól elkülönül, és szabályozásuk szigorúan önálló. Ezek összekapcsolásához szükség van olyan kisegítő molekulákra, amelyek ingajáratzerű működésükkel szubsztrátokat vagy atomcsoportokat szállítanak. Ilyen molekula a karnitin is (3-hidroxi-4-N-trimetil-aminobutánsav; **1. ábra**), amely a nevét a latin *caro, carnis f.* hús szóból nyerte, mivel legnagyobb mennyiségben a harántcsíktal és a szívizomban található.



1. ábra: A karnitinmolekula.

1.1. A karnitin az anyagcserében

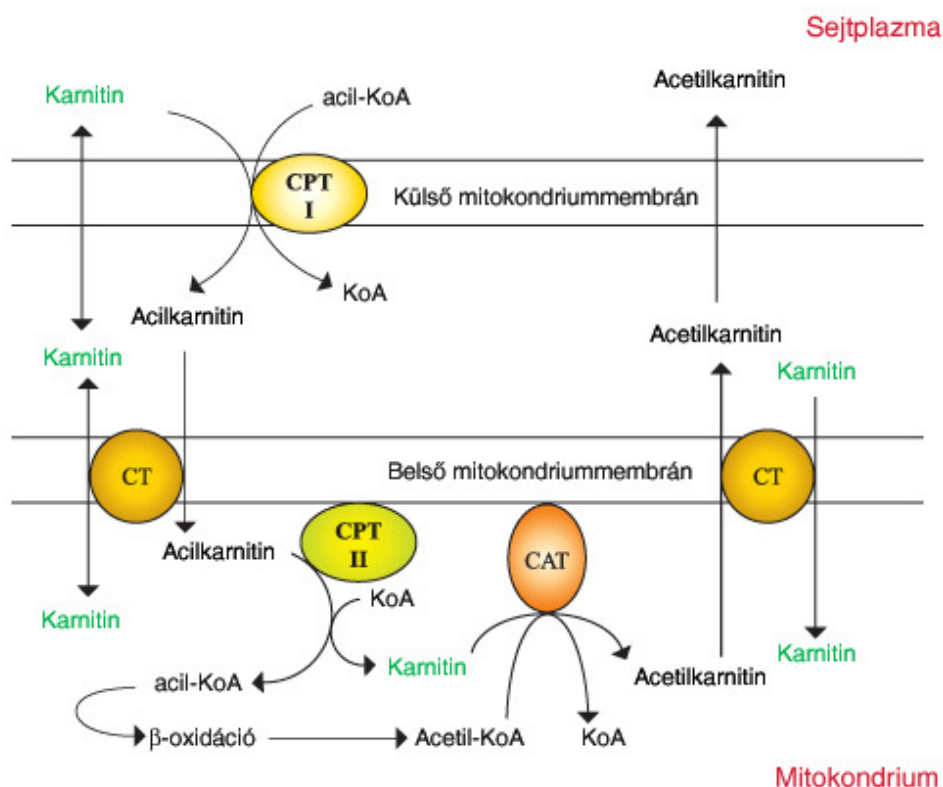
A karnitin vitaminszerű tápanyag: kisebb mértékben a szervezet is képes előállítani a vesében és a májban, döntő mértékben mégis a táplálékkal vesszük magunkhoz, melyből főként a vékonybélben szívódik fel. A legnagyobb raktárak a májban és az izmokban találhatók. A sejtbe irányuló karnitintranszportot az emberi szervezetben az *slc22a* (solute carrier 22) géncsalád termékei, az OCTN1 és OCTN2 szállítófehérjék végzik. Az elsődleges, nagy affinitású szállítófehérje az OCTN2, amely minden, a karnitin forgalmában jelentős sejt plazmamembránjában megtalálható: a bélhámsejtekben a felszívást, a vesecsatornácskákban a szűrlettel kiválasztott karnitin igen jelentős mértékű (> 99%) visszatartását, az izomsejtekben a nyirokból való felvételt látja el. Az OCTN2-t kimutatták a méhlepényben is, az anya és a magzat közti karnitinforgalom tehát igen valószínű. Az *slc22a5* egyes mutációi a transzport zavarai révén súlyos szisztémás betegséget, életveszélyes állapotot, ún. elsődleges karnitinhiányt eredményeznek, amely orális vagy intravénás karnitinbevitellel jól kezelhető.

A karnitin a hidroxilcsoport révén számos karbonsav jellegű vegyülettel képes az észterképzésre. Elsőrendű biokémiai feladata a hosszú szénláncú zsírsavak szállítása a citoplazmából a mitokondrium mátrixába, összekötést teremtve a sejt két funkcionális terének koenzim A készlete között. A sejtplazmában található zsírsavakat először az acil-koenzim A szintetáz aktiválja és kapcsolja a szabad koenzimhez. A folyamat további fő lépéseit a **2. ábra** szemlélteti.

A karnitin ezen kívül is sokrétű funkciót lát el a sejtekben, mint pl. a mitokondriális koenzim A készlet kimerülésének megakadályozása, enzimhibák vagy gyógyszerkezelés következtében képződő mérgező köztitermékek konjugálása és kiürülésének elősegítése, közreműködés számos lipid bioszintetikus átalakításában, a peroxiszóma és a mitokondrium anyagcseréjének összekapcsolása.

A karnitin által képzett észterek, csakúgy, mint a szabad karnitinmolekula, mind megjelennek a vérben és a vizeletben is, ahol többféle módszerrel kimutathatók és mérhetőek. Részletes karnitinprofil, vagyis az egyes karnitinészterek elkülönült, megbízható, minőségi és mennyiségi jellemzése csak a tandem tömegspektrometria alkalmazása óta lehetséges. A korábbi, radioenzimatikus módszerek a szabad karnitin mellett többnyire csak a karnitinészterek kumulatív mennyiségének (acilkarnitin, összészter), valamint a kettő összegének (összkarnitin) megállapítását tették lehetővé. A zsírsavlebontás vagy az ahhoz kapcsolódó biokémiai folyamatok zavarai jellemzően módosítják a vérben keringő karnitinészter profilt. A karnitintranszport fehérjéit kódoló gének mutációi ugyancsak hatással lehetnek a vér karnitintartalmára.

2. ábra. A karnitin szerepe a mitokondriális zsírsav-oxidációban.



1.2. A karnitin és a terhesség

Az emberi újszülött nagy mennyiségű zsírt raktároz, amelynek felhalmozódása zömmel a terhesség utolsó harmadára esik. A magzati szövetekben ekkor egyre fokozódik a *de novo* zsírsavszintézis, ami nagymértékben az anya felől érkező tápanyagokra utalja a fejlődő szervezetet. A terhesség során az anya anyagcsereje fokozatosan alkalmazkodik a magzat igényeihez: először a zsírraktárak feltöltődnek a táplálékból, majd a várandósság késői szakaszában a lipidek lebontása jellemző. A keringő szabad zsírsavak szintje ugyan jelentősen megemelkedik, de csak korlátozottan képesek átlépni a méhlepényen, ehelyett a májban ketontestekké alakulnak, és ebben a formában érik el a magzatot. Itt energiahordozóként és a lipidek felépítéséhez szükséges anyagként is alapvető jelentőségük van, mivel a magzati ketogenezis igen alacsony mértékű.

Az irodalomban közölt adatok szerint a nőkben a szabad karnitin fokozatosan csökken a várandósság alatt, más publikációkban pedig emellett szintén csökkenő vagy változatlan összészter szintet közöltek. A terhesség alatt és végén mért szabad karnitin, összészter és összkarnitin szignifikánsan alacsonyabb, mint a hasonló korú, nem várandós nőkben. A csökkenés döntő része az első trimeszterre esik, és az értékek a szülés után néhány héttel újra elérik a nem terhes nőkre jellemző szinteket. A változások hátterében többféle folyamat feltételezhető, pl. a test folyadéktartalmának emelkedése a terhesség során, fokozott igény a karnitin iránt (toxikus acilcsoportok ürítése), vagy intenzívebb transzport a fejlődő magzat felé. Ráadásul a terhesség alatt mérhető magasabb acil-karnitin clearance ugyancsak a káros anyagok megnövekedett mértékű eltávolítására utalhat.

A karnitin a fejlődő magzat számára is létfontosságú, és a terhesség végső szakaszában fokozódó mértékben raktározódik a májban és az izomban. A méhlepényben kimutatható mind a zsírsav-oxidáció enzimeinek, mind az OCTN2 szállítófehérjének a jelenléte, ami egyrészt a placenta

saját karnitin felhasználását, másrészt az aktív transzportfolyamatokat igazolja. Az anyai vért és a köldökszinórvér karnitin-koncentrációit összehasonlítva többféle ellentmondásos eredményt közöltek az irodalomban mind a szabad mind az észterezett karnitin tekintetében.

1.3. Gyulladásos betegségek és a karnitin

Noha az immunológiai kórképek tünetei és patomechanizmusai igen változatosak, több esetében is felmerült már, hogy összefüggésben állhatnak a karnitin-anyagcsere zavarával. A szervezet jelentős részét vagy egyes kulcsfontosságú szerveket érintő krónikus gyulladás megzavarhatja a karnitinnal kapcsolatos metabolizmust, másrészt pedig az elégtelen karnitinellátás is hozzájárulhat kóros állapotok kialakulásához.

Rheumatoid arthritis (RA). Elsősorban a kéz krónikus ízületi gyulladásos megbetegedése, mely a lakosság kb. 1%-át sújtja, nőkben halmozottan fordul elő. Számos egyéb tünet társulhat hozzá, pl. izombántalmak, amelyeket az izomerő csökkenése kísér. Egy japán csoporton végzett vizsgálat során összefüggést találtak az RA és az *slc22a4* gén egyik intronikus polimorfizmusa (*slc2f2*; GenBank: **rs3792876**) között, ami felvetette a karnitin rendszerrel való kapcsolat lehetőségét. A kérdéses nukleotidcsere a gén kifejeződését gátló RUNX1 transzkripció faktor felismerőhelyében található, és a szabályozófehérje erősebben kötődik a mutáns allélhoz. A RUNX1 génjében szintén felfedeztek egy intronikus SNP-t (*runx1*; GenBank: **rs2268277**), amely az előzótól függetlenül, ugyancsak szignifikánsan társult a betegséggel. Az *slc22a4* és az *slc22a5* gén több potenciális felismerőhelyet tartalmaz a transzkripció faktor számára, így felmerült, hogy a karnitin transzportjának módosulása is szerepet játszhat a kórfolyamatban.

Szisztémás szklerózis (SSc). Autoimmun kötőszöveti betegség, melyre általában fibrózis, gyulladás és elzáródásos vagy atrófiás érbántalmak jellemzők. A 70-es években a karnitin kezelés jótékony hatását írták le a szisztémás szklerózis egyes tüneteire. Tartós alkalmazás mellett a javulás elsősorban a végtagízületek mozgékonyosságát és a bőr lazaságát érintette. A korabeli eltérő terminológia, a kis esetszámok és a kontrollok hiánya miatt azonban az eredmények nehezen értelmezhetőek. Ma a betegségnek két, klinikailag és szerológiailag nagyban eltérő altípusát különböztetik meg: a limitált forma (lSSc) csak a bőrt érinti, a diffúz (dSSc) pedig egyes zsigeri szerveket is. Egy újabb rövid közlemény szerint a szabad karnitin és az összkarnitin szintje szignifikánsan kisebb a betegekben, de csak a diffúz altípus esetén, szemben a lokalizált SSc normál értékeivel.

Gyulladásos bélbetegség (IBD). A bélnyálkahártya változó mértékben kiterjedt, krónikus gyulladása. Két kórkép tartozik ide: a Crohn-betegség (CD) és a fekélyes vastagbélgyulladás (colitis ulcerosa, UC). Mindkét betegség kórmechanizmusában egyaránt szerepet játszik az öröklött és a környezeti háttér, vannak közös genetikai hajlamosító tényezők, továbbá egyes tünetekben előfordulhatnak átfedések. Az 5q31 kromoszómaszakasz IBD5 lókuszaról egyértelműen, azóta többször megismételve megállapították, hogy a CD kialakulásának emelkedett kockázata társítható hozzá. Néhány közleményben az UC-vel kapcsolatban is hasonló eredményre jutottak. Az IBD5 régió belül helyezkednek el az OCTN1 és 2 fehérjéket kódoló *slc22a4* és *slc22a5* gének is, ami felvetette a karnitinszállítás és az IBD közötti funkcionális kapcsolat gondolatát.

Az *slc22a4* 9-es exonjában elhelyezkedő C1672T és az *slc22a5* promóter régiójában található G-207C polimorfizmusok együttesen egy kockázati haplotípust alkotnak, és a TC genotípus szignifikánsan gyakrabban fordul elő a Crohn-betegekben. Ezt azóta a legtöbb ismétléses tanulmány megerősítette, és UC-vel kapcsolatban szintén születtek a TC haplotípus szerepét igazoló, illetve elvető cikkek. A két variáns és az IBD betegségek kapcsolata további polimorfizmusoktól is függhet, amelyek egy kiterjesztett kockázati haplotípust hoznak létre. Ennek a haplotípusnak az elemeiről, így az *slc22a5* gén 2. intronjában elhelyezkedő IGR2230a_1 SNP-ről (GenBank: **rs17622208**) is megállapították, hogy szignifikánsan társul a Crohn-betegséggel.

A karnitin-anyagcsere és az IBD kapcsolatáról eddig viszonylag keveset tudunk. A hagyományos enzimatis radiokémiai meghatározással csökkent szabad és összkarnitinszintet mértek gyermek CD betegekben, valamint emelkedett hosszú szénláncú és összkarnitin, de alacsonyabb szabad karnitin koncentrációt felnőttekben. Az *slc22a* TC haplotípus fibroblasztban módosíthatja az OCTN fehérjék kifejeződését és szállítóképességét, ami felveti a krónikus gyulladással összefüggő funkcionális zavar lehetőségét. Tömegspektrometriás karnitin profil vizsgálat során néhány észter szintjének kisebb mértékű megváltozását tapasztalták CD betegek plazmájában, ami független volt a TC haplotípustól, vagy annak elemeitől.

A vastagbél hámsejtjeinek fontos energiaforrását jelentik a rövid szénláncú zsírsavak karnitínészterei, elsősorban a butiril-karnitin, melynek anyagcseréje UC-ben zavart szenved. A klinikai vizsgálatok alapján a rövid szénláncú zsírsavakat tartalmazó beöntések javítottak egyes kóros tüneteken, propionil-karnitin alkalmazása pedig szintén hatásosnak bizonyult. Az utóbbinak kettős jótékony hatása is lehet, mivel a propionsav energiahordozóként szolgálhat, a karnitin pedig egyrészt a vajsav lebontásának sebesség-meghatározó eleme, másrészt csökkentheti azt az oxidatív stresszt, amely vélhetően az UC kórmechanizmusában is szerepet játszik. Patkány modellben a kísérletesen kiváltott vastagbélgyulladás során csökken az OCTN2 kifejeződése, és ennek következtében a vajsav oxidációja is, ami karnitinkezeléssel visszafordítható. A butiril-karnitin bélben történő felszívódásának nagy affinitású szállítófehérjéje éppen az OCTN2, így az *slc22a5* gént érintő változások befolyásolhatják ezt a folyamatot. A tömegspektrometriás vizsgálatok eredménye hasonló volt, mint a Crohn-betegség kapcsán; a csökkent SCAC szint a megfelelő zsírsavak korlátozott elérhetőségét tükrözheti.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során ESI tandem tömegspektrometria alkalmazásával a következő kérdésekre kerestünk választ:

- Hogyan változik a terhes anyákban a karnitinprofil a várandósság második felében?
- Milyen a köldökzsínórvérből vizsgálható karnitinprofil az újszülöttek édesanyjához és nem terhes nőkhöz viszonyítva?
- Van-e korreláció a magzati és az anyai karnitínészterek, illetve a szabad karnitin mennyisége között?
- Milyen következtetésekre juthatunk az eredményekből a magzati és az anyai karnitinforgalom kapcsolatáról?
- Milyen hatással van a rheumatoid arthritis a betegek karnitinprofiljára az egészséges kontrollokkal összevetve?
- A kockázati faktornak vélt *slc2f2* és *runx1* polimorfizmusok befolyásolják-e a karnitinháztartást a betegekben és a kontrollokbán?
- Milyen hatással van a szisztémás szklerózis a betegek karnitinprofiljára az egészséges kontrollokkal összehasonlítva?
- Van-e jelentősége az SSc altípusainak a karnitin-anyagcsere szempontjából?
- Befolyásolja-e az IGR2230 genotípus a karnitinprofilt, a karnitin anyagcseréjét IBD betegekben, illetve egészséges kontroll személyekben?

3. MÓDSZEREK

3.1. A vizsgálatokban résztvevő személyek.

A munkánk során mintát adó személyeknél kizárható volt az elsődleges karnitinhiány, a máj, a vese, az endokrin szervek betegsége, a keringési vagy az idegrendszer szisztémás megbetegedése, továbbá - a vizsgált betegcsoportok kivételével - kiterjedt gyulladás. A rheumatoid arthritisban, illetve szisztémás szklerózisban szenvedők mintái a Pécsi Tudományegyetem Immunológiai és Reumatológiai Klinikájáról, a terhes anyák és gyermekeik mintái pedig az egyetemünk Gyermekgyógyászati Klinikájáról érkeztek. Az IBD betegeket a Pécsi Tudományegyetem I. számú és a Semmelweis Egyetem II. számú Belgyógyászati Klinikáján kezelték. Mivel az aktuális táplálkozás jelentősen befolyásolhatja az egyes karnitinszterek koncentrációit a testfolyadékokban, minden személytől éhgyomri vért vettünk le a reggeli órákban, kivéve természetesen a szülő anyák és a köldökzsinórvér esetében. Az általunk vizsgált személyek részletes felvilágosítás mellett beleegyezésüket adták mintáik felhasználásához a kutatásban. Munkánk során mindvégig a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Etikai Bizottsága által megállapított szabályokat és az irányadó nemzetközi egyezmények előírásait követtük.

Terhes anya program. A kísérletekbe bevont 37 anya egy a lipid-anyagcsere változásaira és a táplálkozási kiegészítők hatására irányult nemzetközi kutatási együttműködés (NUHEAL) résztvevője volt. Életkoruk $29,0 \pm 0,9$ év (átlag \pm SEM), testtömegük a 20. terhességi héten $68,8 \pm 2,0$ kg volt. A terhesség során a résztvevők testi paramétereit, klinikai és laboratóriumi eredményeit, életvitelük és táplálkozásuk fontos jellemzőit részletesen rögzítették. A szülés körülményeit, az újszülöttek orvosi és laboratóriumi kivizsgálásának eredményeit, valamint táplálkozási sajátosságait egészen a 24. hétig ugyancsak feljegyezték.

A szülések komplikációmentesen zajlottak: húsz fiú (54%) és tizenhét lány (46%) jött világra, ikerterhesség nem volt (születési kor $36,7 \pm 0,3$ hét, hossz 50 ± 1 cm, testtömeg $3,24 \pm 0,08$ kg). Az Apgar pontszámok normálisak voltak. Hat koraszülés történt, de a terhességi idő náluk is meghaladta a 35 hetet. A gyermekek közül húsztól rendelkezünk köldökzsinór-vérmintával.

Kontrollként 22 egészséges, átlagos táplálkozású, korban illeszkedő ($28,5 \pm 1,4$ év) nem várandós nő csoportja szolgált, akiknél nem merült fel fogamzásképtelenség. A terhes anya programban alvadásgátolt vérből nyert plazmát használtunk mintának.

Rheumatoid arthritis. Az American College of Rheumatology szempontjai alapján betegnek diagnosztizált 209 személytől (169 nő, 40 férfi; életkoruk $57,3 \pm 1,0$ év) állt rendelkezésre DNS minta; 73 %-uk pozitív volt rheumatoid faktorra is. A kontroll csoport 217 egészséges, hasonló életkorú személyből állt (122 nő és 95 férfi; életkoruk $56,5 \pm 0,7$ év), akiknek kórtörténetében bármely szisztémás betegség - különösképpen ízületi gyulladás - kizárható volt. Valamennyi betegtől és 142 kontroll személytől rendelkezünk éhgyomri szérum mintával a karnitin vizsgálat elvégzéséhez.

Szisztémás szklerózis. 107 beteg (95 nő és 12 férfi; életkoruk $53,8 \pm 1,1$ év) szolgáltatott szérum mintát a vizsgálatokhoz; a betegség követése során nyert klinikai és laboratóriumi információkat adatbázisban rögzítették. A pácienseket lokalizált és diffúz SSc alcsoportokba sorolták (78, illetve 29 fő). Kontrollként az előzőekhez hasonlóan kiválasztott 47 egészséges személy (32 nő és 15 férfi; életkoruk $51,7 \pm 2,1$ év) mintáját használtuk.

IBD. Részletes klinikai és szövettani vizsgálattal diagnosztizált 200 CD (103 nő és 97 férfi; életkoruk $39,4 \pm 1,0$ év) és 246 UC beteg (138 nő és 108 férfi; életkoruk $44,0 \pm 1,0$ év), illetve 187 egészséges személy (81 nő és 106 férfi; életkoruk $37,7 \pm 0,8$ év) DNS mintáját használtuk a munkánk során. Közülük 76 Crohn-beteg, 43 UC beteg és 45 kontroll személy éhgyomri plazma mintájából tudunk karnitin profilt mérni.

3.2. Genotípus meghatározás

Az IBD betegek és kontrolljaik IGR2230a_1 genotípusának meghatározása PCR-RFLP alapú módszer segítségével történt. A kérdéses polimorfizmus körülötte szakasz felsokszorozására az 5' CAG AAG AAT GCC CTT GAT GTG 3' forward és az 5' TCA GAA GCT GTC CAT CCC AC 3' reverse primereket használtuk, amelyek egy 438 bp hosszúságú terméket fogtak közre. A reakcióelegy 50 µl végtérfogatú volt, 2 egység Taq polimerázt, 5 µl reakciópuffert (100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), minden dNTP-ből 200 µM-t, a két primerből 0,2-0,2 µM-t valamint 1 µg genomi DNS-t tartalmazott. MJ Research PTC-200 készülékben 35 ciklust alkalmaztunk a következő hőprogramon: elődenaturáció - 2 perc 95°C, denaturáció - 30 s 95°C, primerkötődés - 30 s 54°C, szintézis - 30 s 72°C, utólagos lánckiegészítés - 5 min 72°C. A keletkező amplikont *DdeI* enzimmal emésztettük 37°C-on éjszakán át, és a hasítási termékeket 1 % agaróz gélben futtattuk etídium-bromid festés mellett. A vad típusú G allél esetén 122, 128 és 188 bp, az A allél esetében pedig 128 és 310 bp méretű sávokat kaptunk.

3.3. Tömegspektrometria

A vérből centrifugálással (3.000 rpm, 15 perc) nyertük ki a szérumot vagy a plazmát, amelyet felhasználásig -80°C hőmérsékleten tároltunk. 10 µl vortexeléssel homogenizált mintát szűrőpapírra cseppentettünk és 2 órán át hagytuk beszáradni. A képződött foltot pontosan kivágtuk a papírból és 200 µl metanolba helyeztük, amely belső standardként a következő, deutérium-izotóppal jelölt anyagokat tartalmazta: 0,76 µmol/l ²H₃-karnitin, 0,04 µmol/l ²H₃-propionil-karnitin, 0,04 µmol/l ²H₃-oktanoil-karnitin és 0,08 µmol/l ²H₃-palmitoil-karnitin. Enyhe ráztatás mellett 20 percig inkubáltuk, majd a folyadékot új csőbe pipettáztuk, és N₂ áramlás alatt 40°C-on bepárooltuk. Hozzáadtunk 100 µl izobutanol-HCl (3M) elegyet és 65°C-on állni hagytuk 15 percig, majd az előzőek szerint újra bepárooltuk száradásig. A keletkező származékokat acetonitril és víz 80:20 térfogat-százalékos elegyében oldottuk fel.

Egy Waters 2795 HPLC készülék biztosította a 80:20 térfogat-százalékos acetonitril-víz eluens folyamatos, 100 µl/perc sebességű áramlását, amelybe a mintákból 10 µl-t fecskendeztünk be (flow injection üzemmód). A méréseket egy Micromass Quattro Ultima tandem quadrupole tömegspektrométer készüléken végeztük, melyet elektropray ionforrással szereltünk föl. A karnitinszármazékokból jellemzően egy 85Da molekulatömegű, pozitív töltésű részlet hasad ki, ezért 85 m/z anyaión pásztázás üzemmódot használtunk pozitív ion módban.

Minden mérés 4 percig tartott és 78 független pásztázásból állt, ahol az első analizátor a 200-550 m/z tartományon haladt végig, a másodikat pedig az említett fragmentum tömegméretére állítottuk be. A mérésekhez és a számításokhoz a MassLynx 4.0 szoftvercsomagot használtuk. A kapilláris hőmérséklete 100°C volt, a porlasztáshoz (70 l/perc) és az eluens elpárologtatásához (400 l/perc, 350°C) nitrogéngázt használtunk, az ütközési gáz argon volt. Az optimalizált kapillárisfeszültség, kónuszfeszültség és ütközési energia értékei rendre 2,5 kV, 55 V, illetve 26 eV voltak.

3.4. Statisztika

Minden mintát háromszor mértünk le egymás után, és ezek átlagát tekintettük egy mérési eredménynek. A különböző csoportok karnitin eredményeinek összehasonlítására a Student féle *t*-teszt párosítatlan változatát, az azonos személyek különböző időpontokból származó eredményeihez pedig a párosított tesztet használtuk. A szignifikancia határértéke 0,01 volt. A korreláció elemzéséhez a Pearson féle kétváltozós tesztet alkalmaztuk, a genotípusok eloszlásának vizsgálatához pedig a χ^2 tesztet; a szignifikancia határértékét mindkét esetben 0,05-nél állapítottuk meg. A számításokat Excel, illetve SPSS 11.5 programokkal végeztük.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. A karnitin a terhességben

4.1.1. Karnitinprofil a terhesség második felében

A szabad karnitin koncentrációjában szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a 20. és 30. hét között, amely a további szakaszban már nem változott. Az észterek közül a közepes szénláncúak enyhe, a hosszú láncúak erőteljesebb emelkedést mutattak; a változás döntő mértékben a 30. hét és a szülés közti szakaszban következett be. Hasonlóan viselkedett az acetilkarnitin, a többi rövid láncú észter pedig lényegében változatlan maradt. A folyamatok eredőjeként az összesített észterszint ugyancsak szignifikánsan megnőtt az utolsó 10 hétben, az összesített karnitinszint pedig először lecsökkent, majd visszaállt az eredeti állapotra.

A szüléskor mérhető szabad karnitin és észter koncentrációk szinte mind szignifikánsan alacsonyabbak voltak a nem terhes nők vérplazmájában talált értékeknél, kivéve a hosszú szénláncú észtereket, amelyek az anyákban voltak magasabbak. Az összészter és összkarnitin szintje ugyancsak az anyákban volt szignifikánsan alacsonyabb.

A karnitinprofil számszerű adatai és a szignifikáns különbségek az **1. táblázatban** láthatók.

	terhes anya (n=37)			kontroll (n=22)	újszülött (n=20)
	20. hét	30. hét	szülés		
összkarnitin	27,27 ± 1,46 †	24,38 ± 1,35 §	27,17 ± 1,20	43,93 ± 2,12 §	33,18 ± 2,59 § *
C0	19,61 ± 1,25 § †	16,72 ± 0,93	16,75 ± 0,90	27,90 ± 1,42 §	20,00 ± 1,30 *
acilkarnitin	7,66 ± 0,36 §	7,67 ± 0,59 §	10,42 ± 0,54	16,04 ± 0,88 §	13,19 ± 1,54
SCAC					
C2	6,24 ± 0,32 §	6,30 ± 0,56 §	8,48 ± 0,49	13,76 ± 0,80 §	11,24 ± 1,56
C3	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,01 §	0,22 ± 0,02 §
C4	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,33 ± 0,01 §	0,32 ± 0,02 §
C5	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,14 ± 0,01 §	0,14 ± 0,02 §
C6	0,06 ± 0,01 §	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0,01 §	0,11 ± 0,01 §
MCAC					
C8:1	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
C8	0,05 ± 0,01 §	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,01 §	0,05 ± 0,01 § *
C10:1	0,04 ± 0,01 §	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,01 §	0,04 ± 0,01 § *
C10	0,05 ± 0,01 §	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,15 ± 0,01 §	0,04 ± 0,01 § *
LCAC					
C16	0,07 ± 0,01 §	0,07 ± 0,01 §	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,15 ± 0,01
C18:2	0,08 ± 0,01 §	0,08 ± 0,01 §	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,01 §	0,12 ± 0,01 §
C18:1	0,11 ± 0,01 §	0,11 ± 0,01 §	0,24 ± 0,01	0,15 ± 0,01 §	0,12 ± 0,01 §
C18	0,07 ± 0,01 § †	0,05 ± 0,01 §	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01

†: p < 0,01 vs. 30. hét §: p < 0,01 vs. szülés *: p < 0,01 újszülött vs. kontroll

1. táblázat: Plazma karnitinprofil a terhesség különböző időpontjaiban, kontroll nőkben és köldökzsinórvérben (µmol/l; átlag ± SEM)

A korábbi radioenzimatikus módszerek alapján az az egyszerűsített kép alakult ki, hogy a karnitinmetabolitok szintje egységesen süllyedő tendenciát mutat a terhességben. Eredményeink szerint a folyamatok ennél összetettebbek, és a terhességre sajátosan jellemző karnitin-anyagcseréről beszélhetünk. A várandósság alatt fokozatosan csökken a szabad és az észterészített karnitin, de az utolsó szakaszban a hosszú szénláncú észterek és az acetilkarnitin szintje újra emelkedésnek indul, vagy legalábbis a szüléskor magasabb, mint a 30. héten. A terhesség utolsó heteiben a lipolízis és a zsírsavak lebontása fokozódik az anyai szervezetben, és ez megnövekedett karnitinigénnyel társulhat, ami alacsonyabban tarthatja a szabad karnitin szintjét. A mi eredményeink összhangban állnak ezzel a gondolattal, hiszen a terhesség végén éppen a hosszú láncú zsírsavak oxidációjával kapcsolatos észtercsoport szintje emelkedik meg. Véleményünk szerint tehát a várandósság során megváltozó profil a karnitinháztartás sajátos átalakulását tükrözi, amelyben minden bizonnyal szerepe van az anyai szervezet fokozott zsírsav-felhasználásának is. Emellett az is ismeretes, hogy a szülés során csökkenő inzulinszint mellett a glükózon kívül a szabad zsírsavak koncentrációja is jelentősen megemelkedik az anya vérében. A méhösszehúzódások fokozott és hosszan tartó izommunkája ugyancsak a fokozott zsírsav-lebomlás, s ennek következtében a jellegzetes karnitínészter profil alapja lehet.

4.1.2. Karnitinprofil az újszülöttekben

A köldökzsinórvérben a szabad karnitin és a rövid szénláncú észterek szintje szignifikánsan magasabb volt, mint az édesanyákban, a közepes és hosszú szénláncú észtereké pedig többnyire alacsonyabb. A nem terhes kontroll nőkhöz viszonyítva az újszülöttekben az acetilkarnitin nem szignifikánsan, az összkarnitin, a szabad karnitin és a közepes hosszúságú észterek szignifikánsan alacsonyabb, a rövid és hosszú láncú észterek pedig nagyjából hasonló koncentrációban voltak jelen (**1. táblázat**). Így az újszülöttkori karnitinprofil nagymértékben egyedi mintázatot képvisel, amit különböző korcsoportok vizsgálatával teljes vérből is igazoltak.

Megvizsgáltuk az anyák és újszülötteik között az egyes karnitinmetabolitok szintjének korrelációját is. A legerősebb összefüggést a szabad karnitin mutatta, ezen kívül szignifikáns pozitív korreláció adódott a C8:1, C18:1 és C18:2 esetében is. Az irodalmi adatok szerint többnyire felfedezhető pozitív korreláció szabad karnitin, összészter és összkarnitin esetére, vagy csak szabad karnitinra, míg mások nem találtak szignifikáns összefüggést.

A várandós anya és fejlődő gyermeke közti élénk anyagforgalomban a karnitin is részt vesz. Az anyai és a köldökzsinórvér karnitintartalmát illetően az irodalom sok tekintetben ellentmondásos, ami megnehezíti az adatok értékelését. Ugyanígy az anya és a magzat közti karnitinforgalom, valamint a magzat, illetve a méhlepény karnitin-anyagcseréje még korántsem tisztázott minden részletében. A szabad és az acilkarnitinszintben egyesek nem találtak különbséget a köldökzsinór artériás és vénás vére között, máshol a köldökzsinór artériában magasabb szabad karnitin szintet mértek, mint a vénában. Ezek az eredmények inkább amellől szóltak, hogy a magzatban (legalábbis közvetlenül a szülés ideje körül) a karnitinhoz kapcsolt anyagcsere intenzitása még nem jelentős.

Ezt támasztotta alá az a korábban általánosan elfogadott nézet, hogy a magzat elsősorban glükózt használó táplálékként, és a zsírsavak lebontása nem jelentős a születés előtt. Azóta kiderült azonban, hogy a magzati, sőt, az embrionális szövetekben is kifejeződnek a zsírsav-oxidáció enzimeik, bár aktivitásuk jóval a felnőttkori értékek alatt marad, a magzati keringésben pedig jelen vannak a karnitínészterek, noha alacsonyabb koncentrációban, mint a születés után. Ezeket az eredményeket azonban egyelőre óvatosan kell értelmezni, mivel kisszámú *post mortem* minta vizsgálatából származnak.

Az mindenestre bizonyosnak látszik, hogy röviddel a szülés után a terhesség alatt felhalmozott zsírok válnak az újszülött fő energiaforrásává, és a szervezet a glükózegetésről jórészt a zsírsavak oxidációjára áll át. Mivel ebben az időszakban a táplálékbevitel még gyakran csekély, az utód

megfelelő karnitinellátottsága kulcsfontosságúvá válik, és a karnitinprofil is jellemző változásokon megy át. Számos karnitínészter szintje jelentősen megemelkedik a vérben, majd néhány hét alatt újra lecsökken. A születés idején mi sem találtunk fokozott zsírsavlebontásra utaló jeleket a magzati karnitinprofilban, ami azt jelentheti, hogy az újszülött májának időre van szüksége a zsírsavak felhasználására való átálláshoz, a máj szénhidrátkészleteinek csökkenésével párhuzamosan. Ezt az a megfigyelés is alátámasztja, hogy a születés után a folyamatos táplálékellátástól hirtelen megfosztott újszülöttben a szabad zsírsavak koncentrációja igen hamar, néhány óra alatt megemelkedik, azonban ezt csak később (1/2-1 nap) követi a ketonszint növekedése.

A karnitinellátás már az utód fejlődése számára is nélkülözhetetlen, a karnitin pedig a terhesség utolsó szakaszában egyre nagyobb mennyiségben raktározódik a magzati májban és az izomban. A magzat és az újszülött saját szintetikus kapacitása karnitinra nézve valószínűleg meglehetősen korlátozott, amit az is alátámaszt, hogy teljes parenterális táplálás mellett a plazma karnitinszintje jelentősen leesik. A karnitinszintézis képessége vélhetőleg egyes magzati szövetekre és a méhlepényre korlátozódik. Ezek alapján feltételezhető, hogy a magzati és a születéskor mért karnitinszintek nagymértékben az anyai értékektől függenek, amit a korrelációs vizsgálatok eredménye a szabad karnitin esetében meg is erősít. A transzport pontos mechanizmusa még nem ismert teljes mértékben, de a nagy affinitású karnitranszporter OCTN2 fehérje a méhlepényben is kifejeződik; emellett a széles szubsztrátkörű ATB(0,+)₁ szállítófehérje is szóba jön. Ezek a tények azt az elméletet látszanak igazolni, hogy a magzat elsődleges karnitinforrása az anya, és az alacsony szintű magzati és placentális szintézis mellett aktív transzporttal jut át a karnitin az utód keringésébe.

Az OCTN2 jelenléte egerekben szükséges a karnitin placentában és magzatban történő felhalmozódásához. A placenta egyik alapvető energiaforrását a zsírsavak jelentik, a béta-oxidáció enzimrendszere itt is megtalálható és aktív. Ezek alapján feltételezhető, hogy a méhlepényből visszajutó karnitínészterek is hozzájárulhatnak az anyai vérben tapasztalható emelkedéshez. A magzati és az anyai karnitínészterek szintje közti különbségek jelentősek, de heterogének, és lényegében nem figyelhető meg korreláció a kettő között. A kérdést nehezíti, hogy a terhes nőben, a placentában és a magzatban lévő eltérő anyagcsere-állapotok, valamint a karnitinnak és észtereinek mindkét irányú forgalma együttesen határozzák meg a vérben mérhető koncentrációkat. A magzataból az anyai keringésbe visszajutó észterek mennyisége és jelentősége, kóreltani szerepe napjainkban is tudományos vita tárgya.

4.2. A karnitin és az immunbetegségek

4.2.1. Rheumatoid arthritis

A betegek és a kontrollok teljes csoportjainak karnitinprofilját összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy az előbbieknél több észter és a szabad karnitin esetében is kismértékű csökkenés történt, ezek közül a C3, C4, C8:1 és C18:2 érte el a statisztikai szignifikanciaszintet. Rendelkezésünkre álltak a betegek és a kontrollok *slc2f2*, illetve *runx1* SNP genotípus eredményei is. Az egyes genotípus csoportok karnitínészter profiljai között a betegeknél egyetlen esetben találtunk eltérést: a *runx1* polimorfizmusnál a hordozók szignifikánsan magasabb szabad karnitinszinttel rendelkeztek, mint akik nem hordozók. A kontrolloknál ugyanez fordított volt: a homozigóta hordozók szabad karnitinja alacsonyabb volt a többiekénél. Az eredmények azt jelzik, hogy a vizsgált allélokra specifikus eltéréseket a karnitínészter profilban nem találtunk. A betegek a kontrollokhöz képest elhanyagolható mértékben csökkent észterszinteket mutattak. Más szerzők hasonló kis mértékű csökkenésről, illetve emelkedésről számoltak be RA esetében.

4.2.2. Szisztémás szklerózis

Munkánk során mindkét alcsoportba tartozó betegek, illetve korban illeszkedő, egészséges kontrollok karnitinprofilját vizsgáltuk szérumban (**2. táblázat**). Statisztikailag szignifikáns csökkenést találtunk a betegekben C2, C8, C10:1, C10 esetében, növekedést pedig a C5 és C6 észterek szintjében a kontrollokhoz képest. Az összesített észter és karnitin koncentrációk ugyancsak szignifikáns csökkenést mutattak. A szabad karnitin szintje statisztikailag nem különbözött az egyes csoportokban. A közepes szénláncú észterek (C8-C14) összesített értéke szignifikáns csökkenést mutatott a betegekben. A hosszú szénláncú észterek (C16-C18) esetén ugyanez volt tapasztalható, de kisebb mértékben.

A közepes és hosszabb szénláncú telített és módosított acilkarnitinek mennyisége csökkent a betegek vérében, ezért elképzelhető, hogy az SSc kisebb mértékben érinti a karnitin transzportfunkcióját. Az egyik lehetséges célpont a CPT-I enzim, amely a zsírsavlebontás egyik sebesség-meghatározó eleme. Szisztémás gyulladással járó állapotokban a CPT-I gátlódik a szívizomban, például szepszisben vagy ischaemia/reperfusio sérülés esetén.

A koncentrációk megváltozása csekély mértékű volt, így kizárható, hogy elsődleges tényezőként ez állna a kórfolyamatok hátterében. A karnitineszter szintek ilyen irányú és fokú eltolódásait azonban eddig egyetlen ismert és vizsgált kóros vagy élettani állapotban sem találták, így az általunk megfigyelt profil betegség-specifikusnak tekinthető. A szabad karnitin egészséges szintje

	összes beteg (n=107)	limitált SSc (n=78)	diffúz SSc (n=29)	kontroll (n=47)
összkarnitin	46,31 ± 0,74	46,91 ± 0,88	44,67 ± 1,42	48,78 ± 1,46
C0	33,41 ± 0,59	33,64 ± 0,67	32,75 ± 1,27	31,81 ± 0,99
acilkarnitin	12,90 ± 0,27 §	13,27 ± 0,33 §	11,92 ± 0,39 §	16,97 ± 0,64
SCAC				
C2	9,96 ± 0,23 §	10,30 ± 0,29 §	9,04 ± 0,34 §	13,78 ± 0,56
C3	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,31 ± 0,01
C4	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,43 ± 0,02
C5	0,34 ± 0,01 §	0,34 ± 0,01 §	0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,01
C6	0,19 ± 0,01 §	0,19 ± 0,01 §	0,19 ± 0,01 §	0,16 ± 0,01
MCAC				
C8:1	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01
C8	0,12 ± 0,01 §	0,13 ± 0,01 §	0,12 ± 0,01 §	0,17 ± 0,01
C10:1	0,10 ± 0,01 §	0,11 ± 0,01 §	0,09 ± 0,01 §	0,14 ± 0,01
C10	0,14 ± 0,01 §	0,14 ± 0,01 §	0,13 ± 0,01 §	0,20 ± 0,01
LCAC				
C16	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01
C18:2	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01 §	0,13 ± 0,01
C18:1	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01
C18	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01
MCAC összesen	0,63 ± 0,03 §	0,66 ± 0,03 §	0,57 ± 0,04 §	0,85 ± 0,05
LCAC összesen	0,55 ± 0,01 §	0,55 ± 0,02 §	0,54 ± 0,03 §	0,65 ± 0,03

§: p < 0.01 vs. kontroll

2. táblázat: SSc betegek és kontrollok szérum karnitinprofilja (µmol/l; átlag ± SEM)

azt mutatja, hogy a karnitin transzportja és elérhetősége nem károsodik. Eredményeink így nem támogatják az az elképzelést, hogy szisztémás szklerózist gyakran kísérő felszívódási zavarok kapcsolnák össze a betegséget a karnitin-anyagcsere megváltozásával, illetve, hogy a szabad karnitin hiánya miatt csökkent antioxidáns védőhatás alakulna ki, ami azután megemelné a szabadgyökök mennyiségét, vagy hogy ugyanez a hiány zavart okozna a citokinek hatásában, illetve a limfociták aktiválásában.

A betegség altípusait külön megvizsgálva hasonló megállapításokat tettünk, továbbá a diffúz altípusban szenvedőknél a C18:2 statisztikailag szignifikáns csökkenését észleltük. Észrevehető volt ugyanakkor, hogy a ISSc betegek értékei az esetek többségében közelebb voltak a kontroll eredményekhez, mint a dSSc betegekéi. Limitált SSc mellett a közepes szénláncú észterek összesített értéke is lényegesen közelebb volt a normál szinthez, mint a diffúz SSc-ben; a hosszú szénláncúaknál ez a különbség elhanyagolható volt. Bár a limitált és a diffúz SSc klinikailag eltérő kórfolyamatot jelentenek, a karnitinprofiljuk lényegében igen hasonló volt, ami arra utal, hogy a változások eredete közös lehet. Ezért a mi eredményeink nem támasztják alá azt az elképzelést, mely szerint a diffúz forma esetén a szabad és az összkarnitinszint szignifikánsan csökken, a lokalizált SSc mellett pedig változatlan marad.

Ismeretes, hogy a szisztémás szklerózis mintegy 8-10-szer gyakrabban fordul elő nőkben, férfiakban pedig a betegség kifejeződése sokszor súlyosabb. Vizsgálataink során nem állapítottunk meg nemre jellemző eltéréseket a betegek karnitinprofiljában. Ugyancsak nem találtunk sajátos eltéréseket azoknál, akiknek tüdő-, szív- vagy nyelőcső-érintettségük volt.

Minthogy karnitinhoányos állapotról nincs szó, nehéz felbecsülni egy karnitinkezelés esetleges előnyös hatásait. Az előzetes vizsgálatok biztatóak abból a szempontból, hogy a kívülről bejuttatott többlet karnitin talán önmagában is alkalmas bizonyos folyamatok kedvező irányba terelésére, de a betegség lényegét tekintve az igazán jelentős eredmény kérdéses.

4.2.3. Gyulladásos bélbetegség (IBD)

Elvégeztük az IGR2230a_1 genotípus meghatározását a felnőtt magyar lakosság köréből 200 CD és 246 UC betegben, illetve 187 egészséges kontroll személyben. A gyakorisági adatok összhangban állnak a máshol közölt értékekkel. Mindhárom csoport Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. A mutált A allél előfordulási gyakorisága és hordozási aránya magasabb volt a betegekben, mint a kontrollokban, a homozigóták aránya pedig az UC betegek között volt magasabb. A statisztikai elemzés során nem találtunk szignifikáns eltérést egyik csoportban sem a következő összehasonlítások mellett (**3. táblázat**):

- vad típusú allél (G) – mutáns allél (A) gyakorisága,
- hordozók (AG + AA) – nem hordozók (GG) gyakorisága,
- homozigóta vad típus (GG) – homozigóta mutáns allél (AA) gyakorisága.

IGR2230 genotípus	CD betegek (n = 200)		UC betegek (n = 246)		Kontrollok (n = 187)	
	n	%	n	%	n	%
GG	47	23,5	70	28,4	59	31,6
AG	112	56,0	120	48,8	89	47,6
AA	41	20,5	56	22,8	39	20,8
A allél gyakoriság		48,5		47,1		44,6

3. táblázat: *slc22a5* IGR2230a_1 genotípusok Crohn- és UC betegekben, illetve kontroll személyekben

A negatív eredmények hátterében többféle ok is lehet, amely magyarázatul szolgálhat. Mivel az egyes csoportok között az azonos kategóriák gyakorisági értékei nem különböznek jelentősen, vélhetően a genotípus és a betegség közti társulás is kismértékű, amelynek érzékenyebb kimutatásához nagyobb számú személy mintáját kell megvizsgálni. Maga az IBD összetett hátterű és kialakulású betegség, ráadásul az IBD5 szakasz funkcionális feltérképezését és a fenotípushoz való finomabb hozzárendelését célzó erőfeszítések mindeddig nem hoztak következetes, ellentmondásmentes eredményeket. Ezt részben az is magyarázhatja, hogy az etnikai vagy földrajzi különbségek nagyban befolyásolhatják a vizsgálatok kimenetelét. Tovább bonyolítja a képet, hogy mind a CD, mind az UC többféle fenotípus heterogén, egymással is átfedő csoportja, ami az esetek egy részében téves diagnózishoz is vezethet, különösképpen vastagbél-érintettség esetén. Ennek hátterében valószínűleg az áll, hogy az egyes betegek eltérő kockázati allélkészlettel rendelkeznek, ami nagyban befolyásolja a kórkép adott megjelenési formáját. Ez alapján fogalmazódott meg olyan vélemény, hogy az IBD5 szakasz „fenotípus-specifikus” módon társul a Crohn-betegséghez, és ezt is további genetikai variánsok módosíthatják.

Tandem tömegspektrometria segítségével megvizsgáltuk a CD és UC betegek, valamint az egészséges kontroll személyek karnitinszter profilját az IGR2230a_1 genotípus szerinti alcsoportokban. Kíváncsiak voltunk, hogy ez a SNP, befolyásolva az *slc22a5* gén működését, hatással van-e a karnitin anyagcseréjére. Egyetlen statisztikailag szignifikáns eltérést találtunk: az UC betegeknél a hordozókban jelentősen lecsökkent a C2 szint. A szabad karnitin koncentrációja mindenhol normális volt, ami megfelelő karnitin ellátottságra utal.

Következtetésünk szerint az IGR2230a_1 polimorfizmus nem jelent önálló kockázathordozó tényezőt az IBD kialakulását tekintve a magyar népesség körében, de ennek a megállapításnak az érvényességét meg kell vizsgálni nagyobb mintaszám mellett is. Továbbá azt is kijelenthetjük, hogy az IGR2230a_1 genotípusnak nincs értékelhető hatása a karnitin anyagcserére sem az IBD betegeknél sem az egészséges kontroll személyekben.

4.2.4. A karnitin és az immunbetegségek kapcsolata

A karnitin-anyagcsere és az immunrendszer működése közti kapcsolat lehetősége már régen felmerült, a rendelkezésre álló ismeretek mégis szórványosak és bizonytalanok. A korábbi vizsgálatokban enzimatis radiokémiai meghatározás, illetve genetikai, klinikai információk alapján próbálták meg feltárni az összefüggéseket. A karnitin hatása valószínűleg több ponton érvényesülhet; például alapvetően érinti az immunsejtek energiahasznosítását a hosszúláncú zsírsavakból, ami kulcsfontosságú a sejtmembrán szerkezetének és a sejt életképességének fenntartásához. Csökkent triglicerid és emelkedett szabad zsírsav szintet találtak többek között rheumatoid arthritises és IBD betegeknél, ami felvetette a lipid-anyagcsere zavarának és a karnitin rendszer érintettségének lehetőségét is. Patkánykísérletekben a karnitin csökkentette a reaktív szabadgyökök képződését az immunsejtekben, és helyreállította a neutrofil granulociták és a makrofágok hanyatló aktivitását az idős állatokban. Karnitinkezeléssel fokozható volt bizonyos fehérvérsejtek stimulált szaporodása és kemotaktikus aktivitása is. AIDS betegségben a perifériás mononukleáris sejtek karnitintartalma alacsonyabb, mint az egészséges személyekében. Klinikai tanulmányokban többek között igazolták, hogy karnitinkezelés mellett lecsökkent a nyiroksejtek apoptózisa és az oxidatív stressz, gátlódott a gyulladásos citokinek, a Fas/FasL és a kaszpáz-1 kifejeződése. Tömegspektrometriás méréseken alapuló vizsgálatok alapján a karnitinprofil jellegzetes változásokat mutathat a bélcsatorna egyes gyulladásos megbetegedései során.

Fontos feladat lenne tisztázni a karnitin szerepét az immunológiai folyamatokban, illetve egyes immunbetegségek kialakulásával kapcsolatban, valamint feltárni terápiás alkalmazási lehetőségeit és jelentőségét, különös tekintettel az immunválasz folyamatos hanyatlásának ellensúlyozására az öregedés során. Az eddigi eredmények alapján úgy tűnik, hogy a karnitin gyakorolhat bizonyos

módosító hatást egyes immunfolyamatokra, másrészt egyfajta sejtvédő szerepkörben a heveny gyulladások során keletkező oxidatív melléktermékek mennyiségének, és mind az immunsejtek, mind a parenchimális sejtek apoptózisának csökkenését eredményezheti. Mindezt fokozott óvatossággal kell azonban kezelni, hiszen a viszonylag kisszámú *in vitro*, illetve klinikai adat korlátozott következtetéseket enged meg az emberi szervezetben ténylegesen és *in vivo* mutatkozó jelenségekkel kapcsolatban. Az a lehetőség sem zárható ki, hogy a betegben esetleg többféle okból (felszívás, szintézis) megzavart karnitinellátás másodlagosan a mitokondrium-működés és az oxidatív anyagcsere általános leromlását idézi elő, tovább súlyosbítva az immunrendszer állapotát, s a karnitinnal való kezelés erre kifejtett kedvező hatása tűnhet úgy, mintha az alapbetegség bizonyos jellemzőire gyakorolna jótékony befolyást.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

- A terhesség 30. hete és a szülés között az acetilkarnitin, továbbá a közepes és hosszú szénláncú észterek szintje szignifikánsan megemelkedett, a szabad karnitiné pedig a 20. és 30. hét között lecsökkent. A terhes nők észterszintjei és szabad karnitinja szignifikánsan alacsonyabb a hasonló korú nem terhes nőkénel, kivéve a hosszú láncú észtereket, ahol fordított a helyzet. A részletek egy összetett, dinamikus képet mutatnak a terhesség alatti karnitin-anyagcseréről, amelyet a régebbi módszerekkel nem volt mód megismerni. Véleményünk szerint a karnitinprofil megváltozása egyrészt a karnitinkészletek intenzívebb felhasználását, másrészt az anyai zsírsavlebontás fokozódását tükrözi a terhesség második felében, illetve a szülés során.
- Az újszülöttek köldökzsínórvérében egyedi karnitinprofilot találtunk, amely mind az anyákétól, mind a nem terhes nőkéétől, mind pedig az egyéb ismert profiloktól eltér. Az anya és a magzat karnitinmetabolitjai közül a szabad karnitin szignifikáns pozitív korrelációt mutatott. A magzati szabad karnitinszintnek az anyainál magasabb értéke, valamint a pozitív korreláció arra utalnak, hogy mivel a magzatban a karnitin szintézise valószínűleg csekély mértékű, az anya aktív transzportmechanizmusok révén biztosítja a magzat karnitinellátását. Itt az OCTN2 fehérje szerepe nyilvánvalónak látszik.
- Mivel a köldökzsínórvér karnitinprofilja jelentősen eltér a néhány napos újszülöttekéétől, a változások irányából arra következtetünk, hogy a születést követően metabolikus átállás megy végbe a szénhidrátégetésről a zsírsavak oxidációjára.
- A reumatoid arthritis általában a betegek karnitinmetabolit koncentrációinak kismértékű csökkenését okozza az egészséges kontrollokhoz képest. A változások mértéke semmiképpen sem áll arányban egy súlyos kórfolyamat kiváltásával. Az egyes SNP genotípusok ugyancsak nem mutattak különbséget a karnitinprofil tekintetében, így a vizsgált allélvariánsok hatását a karnitin-anyagcserére nem igazoltuk.
- A szisztémás szklerózisban szenvedő betegekben sajátos, eddig le nem írt karnitinprofilot találtunk, melyet elsősorban az acetilkarnitin és a közepes lánchosszúságú észterek, kisebb mértékben a hosszú láncú észterek csökkent értékei jellemeznek az egészséges kontrollokhoz képest. A szabad karnitin szintje megtartott volt, ami nem igazolja a szállítás zavarának, vagy súlyos malabszorpció által okozott karnitinhányának a szerepét a patomechanizmusban. A csökkent észterszintek összefüggésben állhatnak a zsírsav-oxidáció mérséklődésével.
- Az SSc kétféle altípusa között nem találtunk jelentős mértékű különbségeket a karnitinprofilban. Ezért egyrészt a változások közös eredetét feltételezzük, másrészt úgy véljük, hogy a klinikai altípus nincs lényeges hatással a karnitin-anyagcserére.
- Nem sikerült igazolni, hogy az IGR2230a_1 genotípus befolyásolná a karnitin profilot akár CD vagy UC betegekben, akár egészséges kontrollokban, úgy tűnik tehát, hogy ez a SNP nincs hatással a karnitin anyagcserére az OCTN2 fehérje közvetítésével.

6. IRODALOMJEGYZÉK

A doktori munka alapjául szolgáló közlemények

1. **Talián GC**, Komlósi K, Decsi T, Koletzko B, Melegh B. Determination of carnitine ester patterns during the second half of pregnancy, at delivery, and in neonatal cord blood by tandem mass spectrometry: complex and dynamic involvement of carnitine in the intermediary metabolism. *Pediatr Res* 2007 Jul; 62(1):88-92 Impakt faktor: 2,839 (2007)
2. Komlósi K, **Talián CG**, Faragó B, Magyarai L, Cserép V, Kovács B, Bene J, Havasi V, Kiss CG, Czirják L, Melegh B No influence of SLC22A4 C6607T and RUNX1 G24658C genotypic variants on the circulating carnitine ester profile in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008 Jan-Feb; 26(1):61-6 Impakt faktor: 2,270 (2007)
3. **Talián CG**, Kiss CG, Melegh B, Czirják L Features of serum carnitine ester profile in systemic sclerosis. (Magyar Immunológia)
4. **G Talián**, J Bene, L Magyarai, K Komlósi, K Horváth, B Gasztonyi, P Miheller, M Figler, G Mózsik, Z Tulassay, B Melegh Plasma carnitine ester profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis patients with different IGR2230a_1 genotypes. (International Journal of Immunogenetics) Impakt faktor: 1,279

Egyéb saját közlemények:

1. Csikós G, Molnár K, Borhegyi NH, **Talián GC**, Sass M. Insect cuticle, an in vivo model of protein trafficking. *Journal of Cell Science* 1999 Jul; 112 (Pt 13):2113-24. Impakt faktor: 6,044 (1999)
2. Lőw P, **Talián GC**, Sass M Up- and downregulated genes in muscles that undergo developmentally programmed cell death in the insect *Manduca sexta*. *FEBS Letters* 2005; 579: 4943–4948 Impakt faktor: 3,415 (2005)
3. Szolnoki Z, Havasi V, **Talián G**, Bene J, Komlósi K, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Lymphotoxin- α gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel-associated ischaemic stroke. *J Mol Neurosci* 2005; 27(2):205-11 Impakt faktor: 2,555 (2005)
4. 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-1131 polymorphism associates with elevated circulating triglyceride levels and confers susceptibility for development of ischaemic stroke. *J Mol Neurosci* 2006; 29(2):177-83 Impakt faktor: 2,965 (2006)
5. Zoltán Szolnoki, Viktória Havasi, **Gábor Talián**, Judit Bene, Katalin Komlósi, Ferenc Somogyvári, András Kondacs, Mihály Szabó, Lajos Fodor, Anita Bodor, Béla Melegh: Angiotensin II type-1 receptor A1166C polymorphism is associated with increased risk of ischemic stroke in hypertensive smokers. *J Mol Neurosci*. 2006;28(3):285-90. Impakt faktor: 2,965 (2006)

6. Bene J, Magyari 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 Sep; 14;12(34):5550-3
7. Bene J, Komlósi K, Havasi V, **Talián G**, Gasztonyi B, Horváth K, Mózsik 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
8. Bene J, Komlósi K, Magyari L, **Talián G**, Horváth K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mózsik 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(2):345-50. Impakt faktor: 2,339 (2007)
9. 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(1):53-6. Impakt faktor: 1,272 (2007)
10. Faragó B, **Talián GC**, Maász A, Magyari L, Horvatovich K, Kovács B, Cserép V, Kisfali P, Kiss CG, Czirják L, Melegh B. Prevalence of functional haplotypes of the peptidylarginine deiminase citrullinating enzyme gene in patients with rheumatoid arthritis: no influence of the presence of anti-citrullinated peptide antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2007 Jul-Aug; 25(4):523-8 Impakt faktor: 2,270 (2007)

Összesített impakt faktor: 30,213

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A jelen doktori értekezés alapját képező eredmények csak a kollégák és együttműködő partnerek segítségével, támogatása révén jöhettek létre. Ezúton szeretnék mindenkinek köszönetet mondani, aki munkám során tudományos vagy egyéb módon támogatott.

Dr. Melegh Béla professzor úrnak, aki témavezetőként felkeltette és táplálta érdeklődésemet a karnitin-anyagcsere problémái iránt, és intézetvezetői minőségében is folyamatos támogatást nyújtott, ötletekkel, tanácsokkal látott el, valamint biztosította számomra a hiteles és széleskörű szakmai felügyelet körülményeit.

Dr. Kosztolányi György professzor úrnak, az Orvosi Genetikai és Gyermekejlődéstani Intézet professor emeritusának, aki lehetővé tette számomra az elhelyezkedést és a kutatómunkát az intézetben, és aki mindig készségesen segítségemre volt a felmerült problémák megoldásában.

Dr. Czirják László professzor úrnak és dr. Kiss György Csabának az Immunológiai és Reumatológiai Klinika, és dr. Decsi Tamásnak a Gyermekegyógyászati Klinika részéről, akik egyrészt lehetővé tették számomra, hogy az általuk gyűjtött és kezelt mintákkal dolgozhassak, másrészt az adatok értelmezése és a publikáció során mindvégig nélkülözhetetlen támogatást biztosítottak kiemelkedő szakmai jártasságuk és segítőkészségük révén.

Közvetlen kollégáimnak, Berenténé Bene Juditnak, dr. Komlósi Katalinnak és dr. Havasi Viktóriának, illetve dr. Nagy Attilának a Biofizikai Intézetből, akik szellemi és tevételes segítségnyújtásukkal, ötleteikkel és pozitív személyiségükkel nagyban hozzájárultak a munkavégzés sikerének és jó hangulatának biztosításához.

Minden munkatársamnak és Ph.D. hallgatónak a saját, illetve az együttműködő intézetekből, akik akár tényleges segítséggel, akár kedvességükkel könnyebbé tették számomra a feladatok megoldását. Intézetünkből felbecsülhetetlen hozzájárulást kaptam Szántó Ferencnéől és Hartung Mártától, akik a tömegspektrometriás méréseket végezték. Külön szeretnék köszönetet mondani Zentai Piroskának az Immunológiai és Reumatológiai Klinika, valamint dr. Jakobik Viktóriának és Marosvölgyi Tamásnak a Gyermekegyógyászati Klinika részéről.

Ugyancsak szeretném hálámat kifejezni szüleimnek és feleségemnek, akik nemcsak az itt bemutatott munkák, hanem egész eddigi pályám során mellettem álltak, mindenben támogattak, megteremtették számomra a szeretet és biztonság nélkülözhetetlen légkörét.