

# **A karnitin-anyagcsere vizsgálata tandem tömegspektrometriával terhességben, reumatoid 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 Gyermekefejlődéstani Intézet

**2009, Pécs**

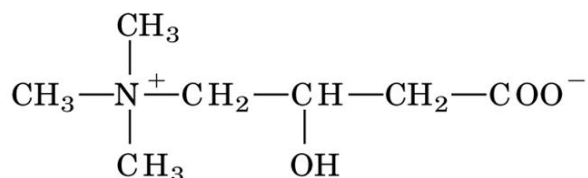
## RÖVIDÍTÉSEK

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

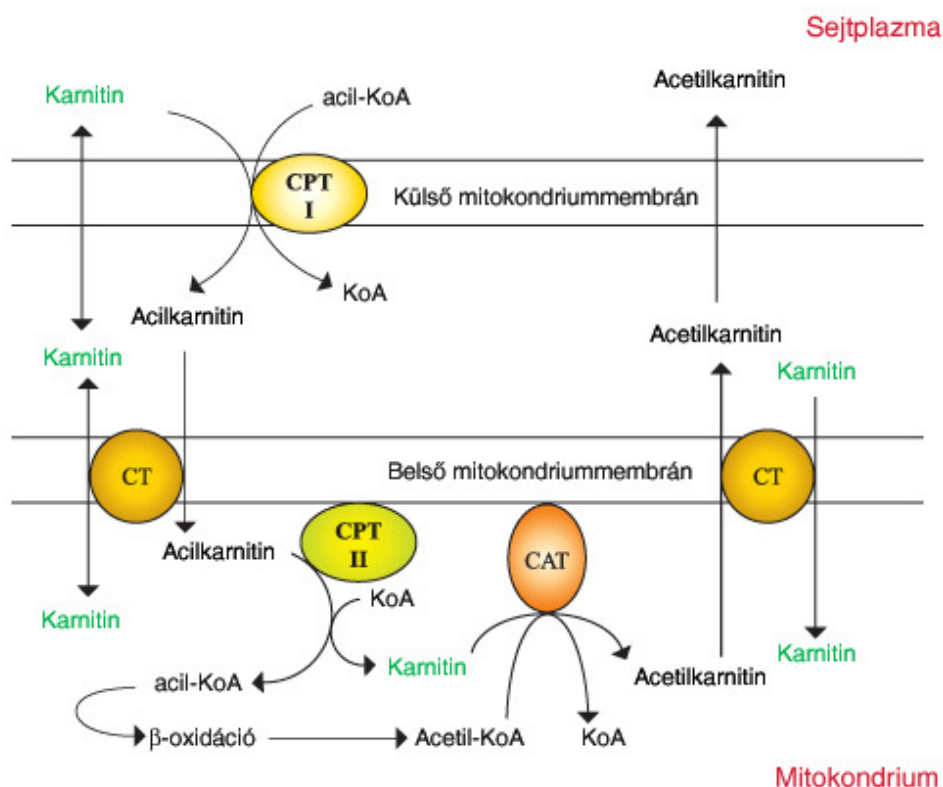
A karnitin vitaminszerű tápanyag: kisebb mértékben a szervezet is képes előállítani a vesében és a májban, döntő mértékben mégis a táplálékkal vesszük magunkhoz, melyből főként a vékonybélben szívódik fel. A legnagyobb raktárak a májban és az izmokban találhatók. A sejtbe irányuló karnitintranszportot 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 acilkarnitin 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 előzőtől 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 lókuszáról 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 karnitinészterei, 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 karnitinészterek, 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 köldökzsínórvér 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  $50 \pm 1$  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 köldökzsínór-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 MgCl<sub>2</sub>), 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 <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-karnitin, 0,04 µmol/l <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-propionil-karnitin, 0,04 µmol/l <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-oktanoil-karnitin és 0,08 µmol/l <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-palmitoil-karnitin. Enyhe rázatás mellett 20 percig inkubáltuk, majd a folyadékot új csőbe pipettáztuk, és N<sub>2</sub> 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  $\chi^2$  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 karnitineszter 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 karnitineszterek, 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 glükózégetésről 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,+)<sub>2</sub> 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 magzattól 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 gyulladásoz állapotokban a CPT-I gátlódik a szívizomban, például szépszisben vagy ischaemia/reperfusio sérülés esetén.

A koncentrációk megváltozása csekély mértékű volt, így kizárható, hogy elsődleges tényezőként ez állna a kórfolyamatok hátterében. A karnitinészter 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)
<b>összkarnitin</b>	46,31 ± 0,74	46,91 ± 0,88	44,67 ± 1,42	48,78 ± 1,46
<b>C0</b>	33,41 ± 0,59	33,64 ± 0,67	32,75 ± 1,27	31,81 ± 0,99
<b>acilkarnitin</b>	12,90 ± 0,27 §	13,27 ± 0,33 §	11,92 ± 0,39 §	16,97 ± 0,64
<b>SCAC</b>				
<b>C2</b>	9,96 ± 0,23 §	10,30 ± 0,29 §	9,04 ± 0,34 §	13,78 ± 0,56
<b>C3</b>	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,31 ± 0,01
<b>C4</b>	0,47 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,43 ± 0,02
<b>C5</b>	0,34 ± 0,01 §	0,34 ± 0,01 §	0,33 ± 0,02	0,29 ± 0,01
<b>C6</b>	0,19 ± 0,01 §	0,19 ± 0,01 §	0,19 ± 0,01 §	0,16 ± 0,01
<b>MCAC</b>				
<b>C8:1</b>	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,08 ± 0,01
<b>C8</b>	0,12 ± 0,01 §	0,13 ± 0,01 §	0,12 ± 0,01 §	0,17 ± 0,01
<b>C10:1</b>	0,10 ± 0,01 §	0,11 ± 0,01 §	0,09 ± 0,01 §	0,14 ± 0,01
<b>C10</b>	0,14 ± 0,01 §	0,14 ± 0,01 §	0,13 ± 0,01 §	0,20 ± 0,01
<b>LCAC</b>				
<b>C16</b>	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01
<b>C18:2</b>	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01 §	0,13 ± 0,01
<b>C18:1</b>	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01
<b>C18</b>	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01
<b>MCAC összesen</b>	0,63 ± 0,03 §	0,66 ± 0,03 §	0,57 ± 0,04 §	0,85 ± 0,05
<b>LCAC összesen</b>	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
<b>A allél gyakoriság</b>		<b>48,5</b>		<b>47,1</b>		<b>44,6</b>

**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 köldökzsinórvérében egyedi karnitinprofilot találtunk, amely mind az anyákétól, mind a nem terhes nőkétlől, 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 köldökzsinórvér karnitinprofilja jelentősen eltér a néhány napos újszülöttekétlől, a változások irányából arra következtetünk, hogy a születést követően metabolikus átállás megy végbe a szénhidrátégetésről a zsírsavak oxidációjára.
- A rheumatoid 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- $\alpha$  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.

**Study of the carnitine metabolism in pregnancy, rheumatoid arthritis,  
systemic sclerosis and IBD by tandem mass spectrometry**

Ph.D. thesis

**Gábor Csaba Talián**

Program:	Multidisciplinary medicine
Program leader:	Dr. Balázs Sümegi
Subprogram B-449:	Human molecular genetics
Subprogram leader and supervisor:	Dr. Béla Melegh

University of Pécs, Faculty of Medicine  
Department of Medical Genetics and Child Development

**2009, Pécs**

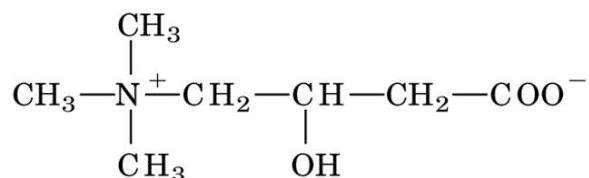
## ABBREVIATIONS

CACT:	carnitine-acylcarnitine translocase
CAT:	carnitine acetyltransferase
CD:	Crohn's disease
CID:	collision induced decay
COT:	carnitine octanoyltransferase
CPT:	carnitine palmitoyltransferase
ESI:	electrospray ionisation
HPLC:	high-pressure liquid chromatography
IBD:	inflammatory bowel disease
LCAC:	long-chain acylcarnitine
MCAC:	medium-chain acylcarnitine
OCTN:	organic cation transporter
PS:	parent scan
RA:	rheumatoid arthritis
RFLP:	restriction fragment length polymorphism
SCAC:	short-chain acylcarnitine
SNP:	single nucleotide polymorphism
SSc:	systemic sclerosis
UC:	ulcerative colitis (colitis ulcerosa)

**Abbreviations of carnitine esters:** When characterising carnitine metabolism, the short names of the individual esters are often used instead of or besides the regular chemical or trivial names. Here „C” and a numeral denote the carbon atom number of the side chain esterified to the carnitine molecule, a colon and a numeral mark the amount of the unsaturated bonds independently of their positions, „DC” refers to double carboxylic acids (e.g. glutaric acid), and „OH” stands for hydroxylation. E.g. **C18:2-OH** indicates a side chain with 18 carbon atoms, two double bonds and one hydroxylation. Free carnitine is signed as **C0**.

## 1. INTRODUCTION

In eukaryotic cells the coenzyme stores of the organelles is usually sequestered, and their regulation is strictly separate. To connect these subcellular spaces such auxiliary molecules are needed that can carry substrates or atom groups in a shuttle-service manner. Carnitine (3-Hydroxy-4-N-trimethylammoniobutanoate; **Figure 1**) is also a compound of that kind, gaining its name from the Latin word *caro*, *carnis f*: 'meat', since it can be found at greatest level in the striated and cardiac muscle.



**Figure 1. The carnitine molecule.**

### 1.1. The carnitine in the metabolism

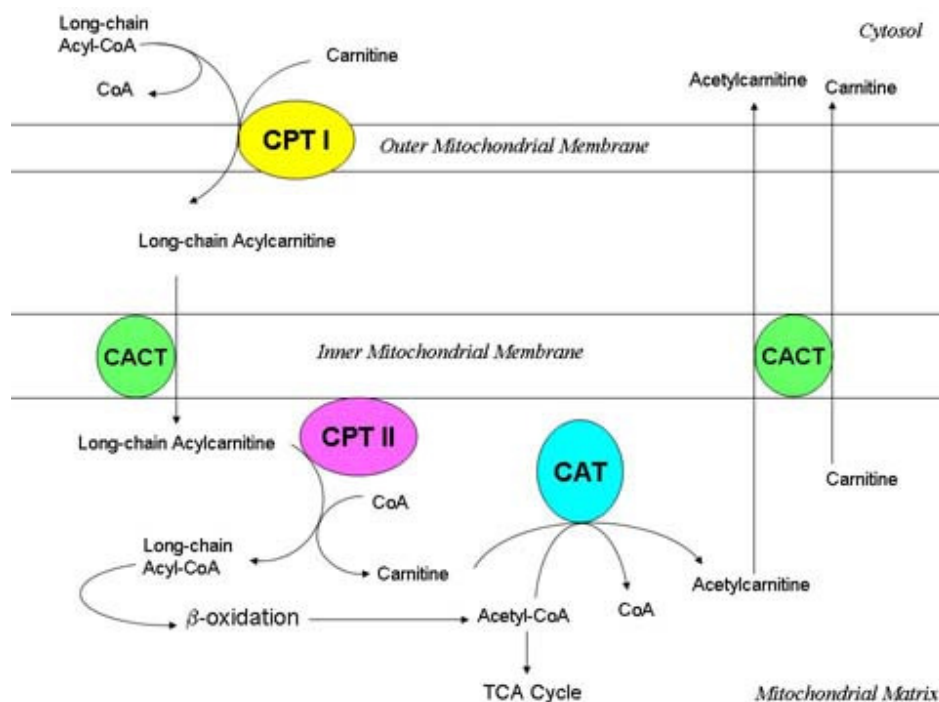
Carnitine is a vitamin-like nutrient that can be produced to a lesser extent by the living organism itself in the kidney and the liver, however, it is decisively taken up from the food, mainly by absorption in the small intestine. The largest stores are located in the liver and the muscles. The inward transport of carnitine in the human cells is accomplished by the products of the *slc22a* (solute carrier 22) gene family, the OCTN1 and OCTN2 carrier proteins. The primary high-affinity carrier is OCTN2, that is spanning the plasma membrane of all cell types involved in the traffic of carnitine: e.g. it performs the absorption in the intestinal epithelium, the very high-rate (>99%) recovery of the carnitine excreted with the filtrate in the renal tubules, and the uptake from the lymph into the muscle cells. OCTN2 was demonstrated in the placenta as well, which makes the carnitine traffic between the mother and the foetus quite probable.

Through its hydroxyl group carnitine is able to form esters with numerous carboxylic acid compounds. Its primary biochemical role is to carry the long-chain fatty acids from the cytoplasm into the mitochondrial matrix, linking the coenzyme A pools of these two functional spaces in the cell. The cytosolic fatty acids are first activated and attached to the free coenzyme by the acyl-coenzyme A synthetase. **Figure 2.** shows the subsequent steps of the process.

Carnitine has multiple additional functions in the cells, such as to prevent the mitochondrial coenzyme A pool from depletion, to form conjugates with toxic intermediates arising from enzyme defects or drug treatment and to promote their elimination, to participate in biosynthetic transformation of many lipids, or to interlink the metabolism of the peroxisome and the mitochondrion.

The esters formed by carnitine, just like free carnitine molecule, all appear in the blood and the urine, where they can be demonstrated and measured by several methods. A detailed carnitine profile, that is, the separate, reliable, qualitative and quantitative characterisation of the individual carnitine esters has only been possible since the introduction of the tandem mass spectrometry. The formerly used radioenzymatic methods made it available to determine only the level of the free carnitine and the cumulative amount of the carnitine esters (referred to as acylcarnitine, total ester), and furthermore, the sum of these two (total carnitine). Disorders of the fatty acid breakdown or other related biochemical processes can specifically modify the circulating carnitine. Mutations in the genes encoding the proteins of carnitine transport may also have impacts on the carnitine content of the blood.

**Figure 2. The role of the carnitine in the mitochondrial beta-oxidation.**



<http://pi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/carnitine/transport.html>

## 1.2. Carnitine and pregnancy

The human newborn stores a great bulk of fat that accumulates mainly during the third trimester of the gestation. That time the *de novo* fatty acid synthesis in the foetal tissues is continuously increasing, which makes the developing organism substantially dependent on the nutrients arriving from the mother. During pregnancy the maternal metabolism gradually accommodates to the foetal requirements: fat depots accumulate from the food at first, then, in the late phase of gestation, the lipid breakdown becomes predominant. Although the level of circulating free fatty acids considerably increases, they can pass through the placenta only to limited extent, instead they are turned into ketone bodies in the liver, and reach the foetus in this way. Here they have a basic significance as energy carriers and raw materials needed to synthesise other lipids, since the foetal ketogenesis is of very low level.

Data published in the literature shows that the free carnitine level in pregnant women gradually decreases, while other studies describe similarly reduced or unchanged total ester concentrations. The free carnitine, total ester and total carnitine levels measured during and at the end of the gestation are significantly lower than those in non-pregnant women of similar age. A decisive part of this decrease takes place during the first trimester, and the corresponding blood levels reach again the values typical of non-pregnant women in a few weeks after labour. In the background of the changes several processes can be assumed, e.g. an increase in the volume of the body fluids during gestation, a higher need for carnitine (to eliminate toxic acyl groups) or more intensive transport towards the developing foetus. The larger acylcarnitine clearance that can be measured during pregnancy may also suggest a greater extent of the removal of noxious compounds.

Carnitine is essential also for the developing foetus, and in the final period of the pregnancy it is stored in the liver and muscles at increasing rates. In the placenta, the presence of both the enzymes involved in fatty acid oxidation and the OCTN2 carrier protein can be shown, which raises the issue of the carnitine utilisation of the placenta itself on the one hand, and active transport processes on

the other. In comparison of the carnitine levels found in the maternal and the umbilical cord blood, diverse and somewhat contradictory results have been published in the literature, regarding both the free and the esterified carnitine.

### 1.3. Inflammatory diseases and carnitine

Although the immunological diseases can show very different symptoms and pathomechanism, the idea that they may be related to the disorders of the carnitine metabolism arose in several cases. Inflammations affecting a considerable part or key organs of the body may disturb the carnitine homeostasis, on the other hand, an insufficient carnitine supply also might contribute to the development of pathological conditions.

**Rheumatoid arthritis (RA).** This is a chronic inflammatory illness primarily afflicting the hand joints, occurring in about 1% of the population with accumulated prevalence among women. It can be associated with many accessory symptoms, e.g. myopathies accompanied by a decrease of muscle strength. In a study on Japanese subjects an association was found between RA and an intronic polymorphism of the *slc22a4* gene (*slc2f2*; GenBank: **rs3792876**), which suggested a possible relationship with the carnitine system. This allelic variant is located in the recognition site of the RUNX1 transcription factor inhibiting the expression of the gene, and the regulator protein binds the mutant allele stronger. An intronic single nucleotide polymorphism (*runx1*; GenBank: **rs2268277**) in the gene of the RUNX1 protein was also shown to be significantly associated to the disease. The *slc22a4* and *slc22a5* genes contain several potential recognition sites for this transcription factor, which suggests that a modified carnitine transport might be involved in the pathological process.

**Systemic sclerosis (SSc).** It is an autoimmune disease of the connective tissue, generally accompanied by fibrosis, inflammation and occlusive or atrophic angiopathies. In the 70s beneficial effects of carnitine treatment on some symptoms of the systemic sclerosis were described. With a permanent administration, primarily the motility of the limb joints and the looseness of the skin were improved. Different disease terminology at that time, small case numbers and the lack of controls make these results, however, hard to be interpreted. To date, systemic sclerosis is distinguished as two clinically and serologically diverse subtypes: limited form (lSSc) affecting only the skin, and diffuse form (dSSc) extending over certain visceral organs, as well. A novel short publication reported on significantly lower free and total carnitine levels in patients, found only in the diffuse subtype, in contrast to the normal values in the lSSc subjects.

#### **Inflammatory bowel disease (IBD).**

This is the inflammation of the intestinal wall with various extents. Two clinical pictures belong here: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC, colitis ulcerosa). Both inherited and environmental background play a role in the pathomechanism of these illnesses, they have common genetic susceptibility factors, and some overlaps may occur in their symptoms. The IBD5 locus of the 5q31 chromosomal region has been unambiguously and repeatedly proved to be associated with an increased risk for the development of CD. Some publications reported on similar results regarding UC. The *slc22a4* and *slc22a5* genes encoding the OCTN1 and OCTN2 proteins, respectively, are also located within the IBD5 region, which suggested the idea of a functional link between carnitine transport and IBD.

The C1672T and G-207C polymorphisms lying in the 9<sup>th</sup> exon of *slc22a4* and in the promoter region of *slc22a5*, respectively, together make a risk haplotype, and the occurrence of the TC genotype is significantly higher in the Crohn patients. Since then it has been confirmed by the most restudies, and some authors also published results on UC where they either approved or rejected the role of the TC haplotype. The relationship of these two variants and the IBD may depend on additional polymorphisms that create an extended risk haplotype. The elements of this haplotype,



like SNP IGR2230a\_1 (GenBank: **rs17622208**) in an intron of the *slc22a5* gene, were shown to be significantly associated to Crohn's disease.

Little is still known about the relationship of the carnitine metabolism and the IBD. Traditional enzymatic radiochemical methods demonstrated lowered free and total carnitine levels in paediatric CD patients, and increased long-chain and total carnitine but decreased free carnitine concentrations in adults. The *slc22a* TC haplotype in fibroblasts may modify the expression and transport ability of OCTN proteins, which arises the possibility of a functional deficiency in the chronic inflammation state. Mass spectrometry carnitine profile studies yielded results showing lesser changes in the levels of a few esters in the blood plasma of CD patients, which were independent of the TC haplotype or its genetic elements.

The carnitine esters of the short-chain fatty acids make an important energy source for the colon epithelium, primarily butyryl-carnitine whose metabolism is disturbed in UC. Based upon clinical investigations, rectal irrigations containing short-chain fatty acids improved certain pathologic symptoms, and administration of propionyl-carnitine was also effective. The latter might have double beneficial impact, since propionic acid can serve as energy carrier, and carnitine itself is in turn a speed-limiting factor of the butyric acid breakdown, and, on the other hand, it can decrease the oxidative stress that is thought to play a role in the UC pathomechanism. In a rat model the experimentally evoked colitis decreased the OCTN2 expression and, consequently, the butyric acid oxidation, that were reversible to carnitine treatment. The high affinity transport protein for the absorption of the butyryl-carnitine in the intestine is no other than OCTN2, therefore changes affecting the *slc22a5* gene may influence this function. The results from mass spectrometry examinations in UC were similar as those in CD; the lower SCAC levels may reflect the limited availability of the corresponding fatty acids.

## 2. AIMS

Our work based on ESI tandem mass spectrometry, focussing on the following questions:

- How does the carnitine profile change in the pregnant mothers during the second half of gestation?
- What is the carnitine profile in the umbilical cord blood, compared to the mothers of the newborns and non-pregnant women?
- Whether is there a correlation between foetal and maternal carnitine ester or free carnitine levels?
- What conclusions can be drawn from the results regarding the connection of the foetal and maternal carnitine traffic?
- What effects does RA have on the carnitine profile of the patients and the healthy controls?
- Whether do the putative risk factors, the *slc2f2* and *runx1* polymorphisms, influence the carnitine metabolism in the RA patients and the controls?
- What impacts does systemic sclerosis exert on the carnitine profile of the patients when compared with healthy controls?
- Whether does the SSc subtype have significance about the carnitine metabolism?
- Whether does the IGR2230 genotype influence the carnitine profile in IBD patients or healthy control subjects?

### 3. SUBJECTS AND METHODS

#### 3.1. Subjects.

The persons giving biological samples to our work were all avoid of primary carnitine deficiency, disease of the liver, kidney, endocrine organs, systemic disease of the circulatory or the nervous system, and – except for the patients examined – extended inflammation. The samples of patients suffering from rheumatoid arthritis or systemic sclerosis arrived from the Department of Immunology and Rheumatology of University of Pécs, and the samples of the pregnant mothers and their newborns from the Department of Paediatrics. The IBD patients were treated at the II. Department of Internal Medicine of the Semmelweis University, Budapest. Since current alimentation can substantially influence the levels of certain carnitine esters in the body fluids, blood after overnight fast was taken from every person in the morning hours, except for the mothers at labour and the umbilical cord blood, of course. All the subjects enrolled gave us informed consent to using their samples in the research. Everywhere in our work we followed the rules laid down by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the University of Pécs and the prescriptions of authoritative international agreements.

**Pregnant mother program.** The 37 mothers taken into the experiments were the participants of international research collaboration (NUHEAL) addressed to the changes of the lipid metabolism and the effects of nutritional supplements. Their age was  $29.0 \pm 0.9$  year (mean  $\pm$  SEM), and their weight at 20<sup>th</sup> week of pregnancy was  $68.8 \pm 2.0$  kg. The anthropometric parameters, clinical and laboratory results, important lifestyle and dietary habits of the participants were recorded in detail throughout gestation. The circumstances of the birth, the results of the physical and laboratory investigations of the newborns and their nutritional features were also noted down, up to the 24<sup>th</sup> week.

Births were free of complications: twenty boys (54%) and seventeen girls (46%) were born, with no twins (gestational age was  $36.7 \pm 0.3$  weeks, body length  $50 \pm 1$  cm, mass  $3.24 \pm 0.08$  kg). Apgar scores were all normal. There were six premature births, but their gestational age also exceeded 35 weeks. We had umbilical blood sample of twenty children. The control group was 22 healthy, age-matched non-pregnant women of usual nutrition with no suspect of infertility. In the pregnant mother programme we applied the plasma as sample gained from anticoagulated blood.

**Rheumatoid arthritis.** We had DNA samples from 209 patients (169 women, 40 men; age  $57.3 \pm 1.0$  year) diagnosed to have RA according to the criteria of the American College of Rheumatology. Seventy-three percent of the patients were positive for rheumatoid factor as well. The control group was 217 healthy, age-matched persons (122 women and 95 men; age  $56.5 \pm 0.7$  year), whose medical history excluded any systemic diseases, especially joint inflammation. To perform the carnitine measurements we had serum samples from every patient and 142 control persons after overnight fast.

**Systemic sclerosis.** One hundred and seven patients (95 women and 12 men; age  $53.8 \pm 1.1$  year) provided serum samples for the examinations; clinical and laboratory data resulting from the follow-up were recorded in a database. Patients were enrolled into localised and diffuse subgroups (78 and 29 persons, respectively). As control, the samples of 47 healthy people (32 women and 15 men; age  $51.7 \pm 2.1$  year) selected as above were used.

**IBD.** Two-hundred CD (103 women and 97 men; age  $39.4 \pm 1.0$  year) and 246 UC patients (138 women and 108 men; age  $44.0 \pm 1.0$  year), whose diagnosis based on detailed clinical and histological investigations, and 187 healthy persons (81 women and 106 men; age  $37.7 \pm 0.8$  year) provided DNA samples for our work. We had also after-fast plasma samples of 76 Crohn's disease and 43 UC patients and 45 control persons for the carnitine profile measurements.

### 3.2. Genotype determination

The IGR2230a\_1 genotype of the IBD patients and their controls was established by a PCR-RFLP method. We amplified the sequence around the polymorphism with the 5' CAG AAG AAT GCC CTT GAT GTG 3' forward and 5' TCA GAA GCT GTC CAT CCC AC 3' reverse primers that flanked a product 438 bp long. The reaction mixture was 50  $\mu$ l, and contained 2 units of Taq polymerase, 5  $\mu$ l reaction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0; 500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 200  $\mu$ M of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of each primer and 1  $\mu$ g genomic DNA. In a MJ Research PTC-200 thermocycler we applied 35 cycles using the following program: predenaturation - 2 min 95°C, denaturation - 30 s 95°C, annealing - 30 s 54°C, extension - 30 s 72°C, final completion - 5 min 72°C. The resulting amplicon was digested with *DdeI* restriction enzyme at 37°C over night, and the fragments were run on 1 % agarose gel and stained with ethidium-bromid. Wild type 'G' allele yielded 122, 128 and 188 bp, while 'A' allele 128 and 310 bp bands.

### 3.3. Mass spectrometry

Serum or plasma was separated from blood by centrifugation (3.000 rpm, 15 min) and was stored at -80°C until use. Ten  $\mu$ l sample homogenised by vortexing was dropped on filter paper and let dry for 2 hours. The resulting spot was accurately excised and put into 200  $\mu$ l methanol containing the following deuterium-labelled isotopes as internal standards: 0.76  $\mu$ mol/L <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-carnitine, 0.04  $\mu$ mol/L <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-propionyl-carnitine, 0.04  $\mu$ mol/L <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-oktanoyl-carnitine and 0.08  $\mu$ mol/L <sup>2</sup>H<sub>3</sub>-palmitoyl-carnitine. While gently shaken the samples were incubated for 20 min at RT, then the supernatant was transferred into a new vial and the methanol was evaporated under N<sub>2</sub> stream at 40°C. One-hundred  $\mu$ l isobutanolic HCl (3M) was added and the sample was let stand for 15 min at 65°C, then the liquid phase was evaporated as before. The resulting derivatives were dissolved in 80%:20% mixture of acetonitrile and water.

A Waters 2795 HPLC instrument supplied the continuous flow of the 80%:20% acetonitrile:water eluent at 100  $\mu$ l/min rate, where 10  $\mu$ l sample was injected into. The measurements were performed with a Micromass Quattro Ultima tandem quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray ion source. The carnitine derivatives typically yield a positively charged fragment of 85Da molecular mass, thus 85 m/z parent scan was used in positive mode. Every measurement took 4 min and contained 78 independent scans, with the first analyser set on the range of 200-550 m/z, and the second one on the mass of the fragment mentioned. For measurements and calculations the MassLynx 4.0 software package was used. The temperature of the capillary was 100°C, the spray (70 L/min) and the evaporation (400 L/min, 350°C) of the eluent was carried out with N<sub>2</sub>, while the collision gas was argon. The optimised capillary voltage, cone voltage and collision energy was 2.5 kV, 55 V and 26 eV, respectively.

### 3.4. Statistics

Each sample was measured in triplicates, and the average was considered as one measurement result. To compare the carnitine levels of different groups the unpaired *t*-test of Student was used, while for the results at different times of the same persons the paired test was applied. The limit of significance was 0.01. The correlation analysis was carried out with Pearson's bivariate test, and the examination of the genotype distribution with  $\chi^2$  (Chi-square) test. The limit of significance was set as 0.05 in both cases. The calculations were performed using Excel or SPSS 11.5 software.

## 4. RESULTS AND DISCUSSION

### 4.1. Carnitine in pregnancy

#### 4.1.1. Carnitine profile in the second half of pregnancy

We found a significant decrease in the concentration of the free carnitine between the 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> weeks, that did not change in the next interval. The level of medium-chain acylcarnitines showed a slight, while that of the long-chain ones a greater increase; the changes predominantly occurred between the 30<sup>th</sup> week and the delivery. Acetylcarnitine had a similar behaviour, but the other short-chain esters remained unaltered. As a result of these processes the total ester concentration also significantly increased in the last ten weeks, and the total carnitine first decreased then the original level was restored.

The free and esterified carnitine levels were almost all significantly lower during birth than those found in the non-pregnant women's blood plasma, except for the long-chain esters that were higher in the mothers. The total ester and total carnitine concentrations were also significantly lower in the mothers.

The numerical data of the carnitine profile and the statistical differences can be seen in **Table 1**.

	Pregnant mother (n=37)			Control (n=22)	Newborn (n=20)
	20 <sup>th</sup> week	30 <sup>th</sup> week	at term		
total carnitine	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 *
acylcarnitine	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<sup>th</sup> week

§: p< 0,01 vs. at term

\*: p< 0,01 newborn vs. control

**Table 1: Plasma carnitine profile in mothers at different times of pregnancy, in non-pregnant women and in the umbilical cord blood (µmol/L; mean ± SEM)**

Based on the earlier radioenzymatic methods a simplified picture arose where the levels of carnitine metabolites showed a uniform trend of decrease in the pregnancy. Our results proved the processes more complex, and carnitine metabolism specific to gestation can be described. During pregnancy the free and esterified carnitine gradually reduce, but in the last phase the long-chain esters and the acetylcarnitine increase again, or at least they are higher at birth than in the 30<sup>th</sup> week. In the last weeks of the gestation lipolysis and fatty acid breakdown is enhanced in the maternal organism, which may be associated with an enlarged demand for carnitine, keeping the level of free carnitine lower. Our results agree with this hypothesis, as at the end of pregnancy it is just the level of the long-chain fatty acid oxidation related carnitine esters that increases. We think therefore, that the changes of the carnitine profile during gestation may reflect the specific rearrangement of the carnitine metabolism where the enhanced fatty acid utilisation of the maternal organism probably has its role. Besides, it is also known that during labour, with declining insulin level, the concentration of free fatty acids along with that of glucose significantly raises in the mother's blood. The intensive and long lasting muscle performance of the womb contractions may also be involved in the enhanced fatty acid breakdown, and, consequentially, the specific carnitine profile.

#### 4.1.2. Carnitine profile in newborns

The levels of free carnitine and short-chain esters in the umbilical cord were significantly higher, and the medium- and long-chain esters predominantly lower than in the mothers. We found an insignificant decrease of acetylcarnitine and a significant reduction of free and total esters and medium-chain esters, and, furthermore, roughly similar short- and long-chain ester levels in the newborns compared with non-pregnant women (**Table 1**). Thus the newborn carnitine profile can be considered as a highly specific pattern, which was already proven also from whole blood investigated in different age groups.

We investigated as well the correlation of the individual carnitine metabolite levels between the mothers and their own newborns. The strongest relationship was found with free carnitine, besides there was significant positive correlation for C8:1, C18:1 and C18:2, too. The most publications in the literature report on the demonstration of positive correlation for free and total carnitine and total esters, or only free carnitine, but some studies resulted in no significant connection.

Carnitine is also involved in the lively traffic of metabolites between the pregnant mother and the developing foetus. Regarding the carnitine content of the maternal and umbilical blood, the literature is contradictory in many respects, which renders the evaluation of data more difficult. Similarly, the traffic of carnitine between the mother and her foetus, and the foetal or placental carnitine metabolism are still far from being unravelled in every detail. Some researchers did not find different free or esterified carnitine levels in the arterious and venous blood of the umbilical cord, while others report on higher free carnitine in the artery than in the vein. These results more favour the thought that the intensity of the metabolism linked to carnitine may not be high in the foetus (at least right around the time of delivery).

It was also underpinned by the widely accepted former opinion that the foetus can primarily utilise glucose as fuel, and the breakdown of fatty acids is not significant before birth. Since then it has been revealed that the enzymes of the fatty acid oxidation are expressed in the foetal, and even in the embryonic tissues, although their activity remains below adult levels, and that carnitine esters are present in the foetal circulation, but in lower concentrations than after delivery. These results, however, must be interpreted with great caution for the present, because they came from the examination of few and *post mortem* samples.

Leastwise, it seems certain that shortly after birth the fats accumulated during the pregnancy become the main energy source of the newborn, and the organism switches from glucose breakdown to the oxidation of fatty acids. Since food intake in this period is often little, the

appropriate carnitine provision of the newborn becomes of key importance, and the carnitine profile undergoes specific changes. The level of numerous carnitine esters significantly increases in the blood, then it falls again in a few weeks. At the time of delivery we did not find signs of enhanced fatty acid breakdown in the foetal carnitine profile, which can mean that the liver of the newborn needs time to switch over the utilisation of fatty acids, in parallel with the depletion of the carbohydrate stores in the liver. This is also supported by the observation that the concentration of unesterified fatty acids increases very soon – in a few hours – after birth in the newborn deprived of his continuous food supply, but this is followed only later (1/2-1 day) by the elevation of the ketone body levels.

The provision of carnitine is already essential for the foetus, and carnitine itself accumulates in increasing amount in the foetal liver and muscles during the last period of the pregnancy. The foetus and the newborn probably has a quite limited inherent capacity of synthesising carnitine, which is also reinforced by the fact that by total parenteral nutrition the plasma carnitine level significantly drops. The ability of carnitine synthesis presumably is confined to certain foetal tissues and the placenta. According to this, one can suppose that the carnitine levels in the foetus and the newborn at birth greatly depend on the maternal values, which was confirmed by correlation examinations on free carnitine. The exact mechanism of the transport is not yet fully known, but the high affinity carnitine transporter OCTN2 protein is expressed also in the placenta. Additionally, the ATB(0,+)<sup>+</sup> transporter protein with broad substrate range can also come into question. These facts seem to verify the theory that the primary carnitine source of the foetus is the mother, and, with the level of foetal and placental carnitine synthesis being low, the carnitine can pass into the foetal circulation by an active transport process.

The presence of OCTN2 in mice is necessary for the accumulation of carnitine in the placenta and the foetus. One of the basic energy source of the placenta is the fatty acids, and the enzyme system of the beta-oxidation can be found also here in an active state. This may suggest that carnitine esters returning from the placenta can also contribute to the concentration increase observed in the maternal blood. The differences between the maternal and the foetal carnitine ester levels are significant but heterogeneous, and they practically do not correlate with each other. The problem is made more difficult by that the carnitine concentrations to be measured in the blood are determined by the different metabolic conditions in the pregnant woman, the placenta and the foetus, together with the bidirectional traffic of the carnitine and its esters. The amount, significance and pathologic role of the carnitine esters getting into the maternal circulation from the foetus is as well nowadays under lively scientific debate.

## **4.2. Carnitine and immunologic diseases**

### *4.2.1. Rheumatoid arthritis*

Comparing the carnitine profiles in the entire groups of the patients and the controls we found that the former showed a slight decrease in the level of the free carnitine and several esters, with C3, C4, C8:1 and C18:2 reaching the level of statistical significance. The *slc2f2* and *runx1* SNP genotype results of the patients and the controls were also available. Between the acylcarnitine profiles of the patient genotype groups we observed one single difference: carriers of the *runx1* mutant allele had significantly higher free carnitine level as the non-carriers. The controls showed a converse picture: the homozygous carriers had lower free carnitine level. These results indicate that we did not find differences specific to the alleles examined in the carnitine ester profile. The patients showed negligibly decreased ester levels compared with the controls. Other authors reported on similarly small reduction or increase of carnitine esters in RA.

#### 4.2.2. Systemic sclerosis

In our study we examined the carnitine profile in serum samples of patients belonging to both disease subtypes and that of age-matched healthy controls (**Table 2.**). We found statistically significant decrease in C2, C8, C10:1 and C10 levels, while increase in C5 and C6 levels, compared with controls. The total ester and total carnitine concentrations showed also a significant reduction in the patients. The free carnitine level did not differ significantly between any groups. The total amount of the medium-chain esters (C8-C14) was significantly lower in the patients. The same held for the long-chain esters (C16-C18) to a lesser extent.

The amount of saturated and modified medium- and long-chain acylcarnitines decreased in the serum of patients, which suggests that SSc exerts some effect on the transport function of carnitine. One of the possible targets is CPT-I enzyme that is a rate limiting factor of the fatty acid breakdown. In systemic inflammatory conditions CPT-I is inhibited in the cardiac muscle, for example in sepsis or ischemia/reperfusion injuries.

The change of the concentrations was in the range that rules it out as primary factor in the background of the pathomechanism. Shifts of acylcarnitine levels in such directions and degrees, however, have not been found yet in any known and studied pathologic or physiologic conditions, so the observed profile can be considered disease-specific. The normal level of free carnitine shows that the transport and availability of the carnitine has not been damaged. Our results can not support

	All patients (n=107)	Limited SSc (n=78)	Diffuse SSc (n=29)	Control (n=47)
<b>total carnitine</b>	46.31 ± 0.74	46.91 ± 0.88	44.67 ± 1.42	48.78 ± 1.46
<b>C0</b>	33.41 ± 0.59	33.64 ± 0.67	32.75 ± 1.27	31.81 ± 0.99
<b>acylcarnitine</b>	12.90 ± 0.27 §	13.27 ± 0.33 §	11.92 ± 0.39 §	16.97 ± 0.64
<b>SCAC</b>				
<b>C2</b>	9.96 ± 0.23 §	10.30 ± 0.29 §	9.04 ± 0.34 §	13.78 ± 0.56
<b>C3</b>	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.31 ± 0.01
<b>C4</b>	0.47 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.50 ± 0.03	0.43 ± 0.02
<b>C5</b>	0.34 ± 0.01 §	0.34 ± 0.01 §	0.33 ± 0.02	0.29 ± 0.01
<b>C6</b>	0.19 ± 0.01 §	0.19 ± 0.01 §	0.19 ± 0.01 §	0.16 ± 0.01
<b>MCAC</b>				
<b>C8:1</b>	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01
<b>C8</b>	0.12 ± 0.01 §	0.13 ± 0.01 §	0.12 ± 0.01 §	0.17 ± 0.01
<b>C10:1</b>	0.10 ± 0.01 §	0.11 ± 0.01 §	0.09 ± 0.01 §	0.14 ± 0.01
<b>C10</b>	0.14 ± 0.01 §	0.14 ± 0.01 §	0.13 ± 0.01 §	0.20 ± 0.01
<b>LCAC</b>				
<b>C16</b>	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01
<b>C18:2</b>	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01 §	0.13 ± 0.01
<b>C18:1</b>	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.23 ± 0.01
<b>C18</b>	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01
<b>total MCAC</b>	0.63 ± 0.03 §	0.66 ± 0.03 §	0.57 ± 0.04 §	0.85 ± 0.05
<b>total LCAC</b>	0.55 ± 0.01 §	0.55 ± 0.02 §	0.54 ± 0.03 §	0.65 ± 0.03

§: p < 0.01 vs. control

**Table 2: Serum carnitine profile of SSc patients and controls (µmol/L; mean ± SEM)**

the conception that the disease and the carnitine metabolism would be connected by the absorption disorders so frequent in systemic sclerosis, or, that a lack of free carnitine would cause reduced antioxidant protection raising then the amount of free radicals, or, that the same lack would disturb the effect of cytokines and the activation of lymphocytes.

A separate examination of the disease subtypes led to similar conclusions, additionally, we observed a significant decrease of C18:2 in the diffuse SSc group. It is also conspicuous that in most cases the concentrations of ISSc patients were closer to the control results than those of the dSSc patients. The cumulative level of medium-chain acylcarnitines with limited sclerosis was closer again to the control value than with diffuse SSc, but this difference in long-chain acylcarnitines was negligible. Although the two subtypes represent clinically diverse forms of the disease, their carnitine profile was essentially quite similar, which suggests that the origin of the changes can be common. Therefore, our results do not support the idea that in the diffuse SSc the levels of free and total carnitine significantly decrease, while they remain unchanged in the limited sclerosis.

It is well known that systemic sclerosis occurs 8-10 times more frequently in women, but in men the disease expressivity is often much more severe. Our examinations did not reveal any gender-specific difference in the carnitine profile of the patients. Similarly, we did not find characteristic changes in those patients with oesophagus, lung or heart involvement.

Since it is not about a carnitine deficiency condition, it is hard to estimate the potential advantages of the carnitine treatment. The preliminary studies are encouraging in that the exogenous excess carnitine alone might turn certain processes into the desired direction, but really significant results concerning the essentials of the disease are questionable.

#### 4.2.3. Inflammatory bowel disease (IBD)

We performed the determination of the IGR2230a\_1 genotype in 200 CD and 246 UC patients and 187 healthy control persons from the adult Hungarian population. The prevalence data are in concordance with results published elsewhere. All the three groups was in Hardy-Weinberg equilibrium. The incidence and carriage of the mutated allele A was higher among the patients than in the controls, the rate of the homozygotes, in turn, was higher in the UC subjects. The statistical analysis did not reveal significant differences in any groups using the comparisons as follows (**Table 3**):

Wild-type allele (G) vs. mutated allele (A)

Carriers (AG + AA) vs. non-carriers (GG)

Wild-type homozygotes (GG) vs. mutated homozygous (AA)

IGR2230 genotype	CD patients (n = 200)		UC patients (n = 246)		Controls (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
<b>A allele prevalence</b>		<b>48.5</b>		<b>47.1</b>		<b>44.6</b>

**Table 3: *slc22a5* IGR2230a\_1 genotypes in Crohn and UC patients, and control persons**



Several causes may underlie the negative results, offering possible explanations. Since the frequency values of the identical categories between the individual groups do not differ significantly, we can suggest that the association of the genotype and the disease is weak, and it might need a study with greater case numbers to demonstrate it. IBD itself has a composite background and pathomechanism, in addition, the efforts to functionally map the IBD5 region and to attribute it to the phenotype in a more delicate way did not yield consistent and uncontradicted results yet. This can partially be explained by that ethnic or geographic differences may largely bias the outcome of the experiments. The situation is further complicated because both CD and UC are heterogeneous and overlapping clinical pictures of several phenotypes, which may lead to misspecification in the diagnosis, especially with colon involvement. It probably has the background that the individual patients have distinct at-risk allele combinations, which may substantially influence the appearance of the disease. This was the base of the opinion that the IBD5 region associates to Crohn's disease in a 'phenotype-specific' manner, which can be further modified by additional genetic variants.

We examined by tandem mass spectrometry the carnitine ester profile of CD and UC patients and healthy control persons stratified by their IGR230a\_1 genotype. We wanted to know if this SNP has an impact on the carnitine metabolism, by influencing the function of the *slc22a5* gene. We found one single statistically significant difference: in the UC carriers the C2 level was decreased. The free carnitine concentration was normal everywhere, showing appropriate carnitine supply. We conclude that the IGR2230a\_1 polymorphism does not represent a substantive risk factor for the IBD in the Hungarian population, but the validity of this assessment should be examined with a larger sample size. Moreover, we can state that the IGR2230a\_1 genotype has no significant effect on the carnitine metabolism either in IBD patients or in healthy control persons.

#### *4.2.4. The relationship of the carnitine and the immunological diseases*

The connection between the carnitine metabolism and the operation of the immune system was suggested long before, but our knowledge is still sparse and uncertain. Formerly, efforts were made to reveal the relationships using enzymatic radiochemical determination and genetic or clinical information. The effect of the carnitine is probably exerted at multiple points; for instance, it basically concerns the energy utilisation from long-chain fatty acids of the immune cells, which is a key to maintain the structure of the plasma membrane and the cellular viability. Reduced triglyceride and increased unesterified fatty acid levels were found in rheumatoid arthritis and IBD patients among others, which raised the possibility of the dysfunction of the lipid metabolism and the involvement of the carnitine system. In rat experiments the carnitine decreased the generation of reactive free radicals in the immune cells, and restored the declining activity of the neutrophil granulocytes and macrophages in the old animals. The carnitine treatment was able to enhance the stimulated proliferation and the chemotactic activity of certain leukocytes. The carnitine content of the peripheral mononucleate cells is lower in AIDS patients than in healthy persons. Inter alia, it was proved in clinical studies that the carnitine treatment decreased the apoptosis of the lymphocytes and the oxidative stress, inhibited the expression of inflammatory cytokines, Fas/FasL and caspase-1. The examinations based on mass spectrometry measurements showed characteristic changes of the carnitine profile in some inflammatory diseases of the intestinal tract.

It is highly important to clarify the role of the carnitine in the immune processes or in the development of certain immunological disorders, moreover, to reveal its potential therapeutic applications and significance, regarding especially the counteraction to the continuous decline of the immune response in aging. The results to date suggest that the carnitine may have some modifying effect on certain immunological events, otherwise, it can reduce the amount of the oxidative by-products formed in acute inflammations and the extent of the apoptosis of both the

immune cells and the parenchymal cells. This must be handled, however, with increased caution since the low number of *in vitro* and clinical data allow us to draw limited conclusions about the actual and *in vivo* processes in the human organism. We can not exclude the possibility that a multiply (absorption, synthesis) disturbed carnitine supply secondarily causes a general deterioration of the mitochondrial function and the oxidative metabolism, further aggravating the state of the immune system. A favourable effect of the carnitine treatment on these events may seem as if it beneficially influenced certain properties of the basic disease.

## 5. SUMMARY

- The level of acetylcarnitine and the medium- and long-chain esters significantly increased between the 30<sup>th</sup> week of the pregnancy and delivery, while that of the free carnitine reduced between the 20<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> weeks. The ester and free carnitine concentrations of the pregnant mothers were significantly lower than those of the non-pregnant women of similar age, except for the long-chain esters where the opposite was the case. The details show a composite and dynamic view about the carnitine metabolism during gestation, which was not available by the formerly used methods. In our opinion the change of the carnitine profile reflects the more intensive utilisation of the carnitine stores, and the enhancement of the maternal fatty acid breakdown in the second half of the pregnancy and the delivery on the other hand.
- In the umbilical blood of the newborns a unique carnitine profile was found that differed from that of both the mothers and the non-pregnant women, such as from other known profiles. The free carnitine was in significant positive correlation between the mothers and their babies. The higher value of the foetal than the maternal free carnitine, together with the positive correlation, suggest that, since the foetal carnitine synthesis is probably of low intensity, the mother ensures the carnitine provision of the foetus by active transport mechanisms. The role of the OCTN2 protein seems here conspicuous.
- As the carnitine profile of the umbilical cord markedly differs from that of newborns a few days old, the directions of the changes allows us to conclude that after delivery a metabolic shift takes place from the carbohydrate breakdown to the oxidation of fatty acids.
- Rheumatoid arthritis generally causes a small decrease in the concentrations of the patients' carnitine metabolites compared with the healthy controls. The extent of these changes is by no means proportional to evoking a severe pathological event. The carriers of the individual SNP genotypes did not show any difference in their carnitine profiles again, therefore the effect of the allelic variants examined on the carnitine metabolism was not to be proven
- Patients suffering from systemic sclerosis had a specific and yet undescribed carnitine profile that is characterised by the lower levels of primarily the acetylcarnitine and medium-chain esters, and, to a lesser extent, the long-chain esters, compared with the healthy controls. The concentration of the free carnitine was maintained, which did not prove that its transport disorder or a shortage of carnitine caused by severe malabsorption would have a role in the pathomechanism. Reduced ester levels may be related to the moderation of the fatty acid oxidation.
- No significant differences were found between the carnitine profiles of the both SSc subtypes. Therefore, we assume the common origin of the changes, and we believe, on the other hand, that the clinical subtype has no essential influence on the carnitine metabolism.
- It was not verified that IGR2230a\_1 genotype influences the carnitine profile in either CD and UC patients or healthy controls, hence this SNP seems to have no effect mediated by the OCTN2 protein on the carnitine.

## 6. LIST OF PUBLICATIONS

### The thesis is based on the following publications

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 Impact factor: 2,839
2. Komlósi K, **Talián CG**, Faragó B, Magyari 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 Impact factor: 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 Magyari, 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) Impact factor: 1,279

### Other publications:

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. Impact factor: 6,044
2. Lõw 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 Impact factor: 3,415
3. Szolnoki Z, Havasi V, **Talián G**, Bene J, Komlósi K, Somogyvári F, Kondacs A, Szabó M, Fodor L, Bodor A, Melegh B. Lymphotoxin- $\alpha$  gene 252G allelic variant is a risk factor for large-vessel-associated ischaemic stroke. *J Mol Neurosci* 2005; 27(2):205-11 Impact factor: 2,555
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 Impact factor: 2,965
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. Impact factor: 2,965

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. Impact factor: 2,339
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. Impact factor: 1,272
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 Impact factor: 2,270

Cumulative impact factor: 30,213

## 7. ACKNOWLEDGEMENTS

The results founding the present doctoral dissertation was only achieved with the help and support of our colleagues and co-operating partners. Hereby I would like to express my greatest thank to everyone who assisted my work scientifically or in other ways.

First of all to my supervisor Prof Dr Béla Melegh who inspired and sustained my interest in the problems of the carnitine metabolism, gave continuous support as the Head of Department of the Medical Genetics and Child Development, providing me with hints and advice, and assured me the authentic and extensive vocational surveillance.

To Prof Dr György Kosztolányi, the former Head of Department, professor emeritus, who allowed me to settle and run research in the Institute, and always was willingly helpful in solving the problems arisen.

To Prof Dr László Czirják and Dr Csaba György Kiss from the Department of Immunology and Rheumatology, and Dr Tamás Decsi from the Department of Paediatrics, who permitted me to work with the samples they had collected, and provided essential assistance all along in the interpretation of data and the publication process, having prominent professional skills and helpfulness.

To my nearest colleagues, Dr. Judit Bene, Dr Katalin Komlósi and Dr Viktória Havasi, and furthermore, Dr Attila Nagy from the Department of Biophysics, who greatly contributed to the successful work and the good atmosphere giving intellectual and manual help, good ideas and positive personality.

To all of my co-workers and the Ph.D. students at the Department and the collaborating institutes, who either assisted me or made the progress easier to me simply by their loveliness. I obtained invaluable contribution from Ferencné Szántó and Márta Hartung from our Department, who carried out the greatest part of the mass spectrometry measurements. I wish to say special thanks to Piroska Zentai from the Department of Immunology and Rheumatology and Dr Viktória Jakobik and Tamás Marosvölgyi from the Department of Paediatrics.

Additionally and most cordially I want to express my gratitude to my parents and my wife who have stood by me all in my career until now, supported me in everything and created me an indispensable atmosphere of love and safety.