

Μελέτη της ανεπάρκειας της καρνιτίνης καθώς και της έκφρασης των πρωτεϊνών μεταφορέων της κατά τη φυσιολογική κύηση

Μαρινόπουλος Σπύρος¹, Παππά Καλλιόπη¹, Δρακάκης Πέτρος¹, Ανάγνου Νικόλαος², Αντσακλής Άρις¹

¹ Α' Μαιευτική - Γυναικολογική Κλινική Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα»

² Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών

Αλληλογραφία: Μαρινόπουλος Σπυρίδων, Μαιευτήρας - Γυναικολόγος
Β. Σοφίας 86 και Λούρου, 115 28 Αθήνα
Τηλ. 210 6800480 - 6944 383 601
E-mail: spyro@hol.gr

Περίληψη

Εισαγωγή: Η καρνιτίνη κατέχει κεντρικό ρόλο στη μεταφορά των λιπαρών οξέων μακράς αλύσου, προκειμένου να οξειδωθούν και να καλυφθεί ενεργειακά ο οργανισμός. Η έλλειψή της εκφράζεται ως διαταραχή του διάμεσου μεταβολισμού. **Σκοπός:** Κατά τη διάρκεια της κύησης, η ολική καρνιτίνη του πλάσματος μειώνεται προοδευτικά και φθάνει τα επίπεδα ασθενών που πάσχουν από έλλειψη καρνιτίνης, χωρίς ωστόσο την εκδήλωση συμπτωματολογίας. **Σκοπός μας** η διεξοδική μελέτη της βιοσύνθεσης της καρνιτίνης στις έγκυες γυναίκες. **Υλικό και Μέθοδοι:** Το υλικό της προοπτικής έρευνάς μας περιλαμβάνει υγιείς έγκυες (ομάδα μελέτης) και υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας που χειρουργήθηκαν για καλόηθες γυναικολογικό νόσημα (ομάδα ελέγχου). **Μετρήθηκαν τα μόρια:** 4-N-trimethylamino-butyrate (βουτυροβεταΐνη), L-καρνιτίνη, ακυλκαρνιτίνη, 3-υδροξυ-6-N-τριμεθυλλυσίνη (HTML) και 6-N-τριμεθυλλυσίνη (TML) στο μητρικό αίμα, στο αίμα της ομφαλικής αρτηρίας, στο αίμα της ομφαλικής φλέβας, στο αμνιακό υγρό και στα μητρικά ούρα. **Αποτελέσματα:** Στα ούρα και στο αίμα της ομάδας ελέγχου, οι μέσες τιμές της L-καρνιτίνης και του προδρομού μορίου της βουτυροβεταΐνης είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερες. Παρατηρείται ελεύθερη διακίνηση της ολικής καρνιτίνης προς το αμνιακό υγρό και απέκκρισή της στα ούρα, παρά τα χαμηλά της επίπεδα στο πλάσμα. **Συμπεράσματα:** Ορισμένα μόνο κλάσματα καρνιτίνης είναι μειωμένα στις έγκυες, υποδηλώνοντας πιθανά τις πραγματικές ανάγκες του εμβρύου για κλάσματα καρνιτίνης που δεν μπορεί να βιοσυνθέσει. Αυτό αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον στις πρόωρες κύσεις. Εκεί η εξωγενής χορήγηση κλασμάτων καρνιτίνης βελτιώνει το σωματικό βάρος και την αναπνευστική ικανότητα.

Λέξεις κλειδιά: ανεπάρκεια καρνιτίνης, κύηση

Εισαγωγή

Η καρνιτίνη (4-τριμεθυλ-αμινο-3-υδροξυβουτυρικό οξύ) είναι μια υδατοδιαλυτή τεταρτοταγής αμίνη, η οποία σε συνδυασμό με τις καρνιτινο-ακυλ-τρανσφεράσες (carnitine acyltransferases, CAT) οδηγεί τα ενεργοποιημένα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (long chain fatty acids, LCFA) στα μιτοχόνδρια, τα υπεροξυσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, προκειμένου να αποτελέσουν το υπόστρωμα β-οξειδωσης για την παραγωγή ενέργειας. Η πλήρης χημική δομή της, $[C_7H_{15}NO_3]$ έγινε γνωστή το 1927. Πρόκειται για μια υδατοδιαλυτή τεταρτοταγής αμίνη με ιδιότητες βιταμίνης (Gulewitsch, 1905; Tomita, 1927). Το 75% των πηγών καρνιτίνης για τον ανθρώπινο οργανισμό προέρχονται από τη διατροφή (π.χ. κόκκινο κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα για τον ενήλικα, μητρικό γάλα για το νεογνό) και το υπόλοιπο 25% συντίθεται ενδογενώς από τη λυσίνη και τη μεθειονίνη. Αν και πολλοί ιστοί μπορούν να συνθέσουν το άμεσο πρόδρομο μόριο της καρνιτίνης (γ-βουτυροβεταΐνη), τους λείπει το τελικό βιοσυνθετικό ένζυμο που υδροξυλιώνει την γ-βουτυροβεταΐνη σε καρνιτίνη. Η τελική αντίδραση υδροξυλίωσης σε γ-βουτυροβεταΐνη πραγματοποιείται στο ήπαρ και τα νεφρά. Στον καρδιακό και στους σκελετικούς μυς η καρνιτίνη μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας. Απαραίτητα στοιχεία για τη βιοσύνθεση της καρνιτίνης, είναι η παρουσία και άλλων υποστρωμάτων όπως το ασκορβικό οξύ, η νιασίνη, η βιταμίνη Β6 και ο δι-σθενής σίδηρος. Αν κάποιο από αυτά τα στοιχεία λείπει, τότε διαταράσσεται η σύνθεση της καρνιτίνης. Η ολική καρνιτίνη αποτελείται από την ελεύθερη καρνιτίνη και τους εστέρες της, περιέχοντας ακυλ-ομάδες μικρής ή μακράς αλειφατικής αλύσου. Στο πλάσμα το μεγαλύτερο μέρος της εστεροποιημένης καρνιτίνης βρίσκεται ως ακυλ-καρνιτίνη. Ο συνολικός αριθμός των εστέρων της καρνιτίνης συνιστούν την ακυλοκαρνιτίνη. Όταν ο ρυθμός οξειδωσης των λιπαρών οξέων αυξάνει, όπως στην νηστεία, ή όταν καταναλώνονται υψηλές ποσότητες τροφών πλούσιων σε λίπη, τα επίπεδα ακυλ-καρνιτίνης αυξάνονται στο αίμα. Στο πλάσμα των υγιών ενηλίκων η ολική καρνιτίνη (TC) κυμαίνεται από 30-80 $\mu\text{mol/l}$. (Rebouche and Engel, 1983) Οι μέσες τιμές στο πλάσμα των ανδρών ($59,3 \pm 11,9 \mu\text{mol/l}$) τείνουν να είναι υψηλότερες από αυτές των γυναικών ($51,5 \pm 11,6 \mu\text{mol/l}$). Η αποθήκευση της καρνιτίνης γίνεται κυρίως στους σκελετικούς και στον καρδιακό μυ, με αποτέλεσμα αυτοί να περιέχουν το 90% της συνολικής καρνιτίνης του σώματος

(Rebouche, 1992; Tanphaichitr and Leelahagul, 1993), ενώ μικρότερες συγκεντρώσεις βρίσκονται στο ήπαρ, στους νεφρούς, στους όρχεις, στην επιδιδυμίδα και στον εγκέφαλο. Αυτό συμβαίνει, γιατί, στους μυς και στην καρδιά, οι ενεργειακές ανάγκες είναι μεγαλύτερες. Στο αίμα, η καρνιτίνη παρουσιάζει τις μικρότερες συγκεντρώσεις από όλους τους ιστούς και αποτελεί περίπου το 1-2% της συνολικής καρνιτίνης του σώματος.

Στον άνθρωπο υπό φυσιολογικές συνθήκες, η καρνιτίνη βρίσκεται στον ορό του αίματος σαν ελεύθερη σε ποσοστό 75-80% και σαν ακυλ-καρνιτίνη σε ποσοστό 20-25%. Ο λόγος ακυλ-καρνιτίνης προς ελεύθερη καρνιτίνη (AC/FC), φυσιολογικά είναι περίπου 0.25, ενώ ένας λόγος μεγαλύτερος του 0.4 σχετίζεται με ανεπάρκεια της καρνιτίνης. (Bohles et al., 1994) Καίτοι το 99% της καρνιτίνης είναι ενδοκυττάριο, η σχέση ακυλ-καρνιτίνης προς ελεύθερη καρνιτίνη στο πλάσμα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις μεταβολές που συμβαίνουν μέσα στο μιτοχόνδριο. Μια κατάσταση νηστείας, που έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη κετογένεση, οδηγεί σε μείωση της ελεύθερης καρνιτίνης στο πλάσμα και αύξηση της ακυλ-καρνιτίνης, έτσι ώστε να υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ κετονών και ακυλ-καρνιτίνης (Frohlich et al., 1978; Seccombe et al., 1978; Rebouche and Mack, 1984).

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, σε υγιή άτομα, άνω του 90% της καρνιτίνης, που διηθείται στους νεφρούς, επαναρροφάται (Engel et al., 1981). Δηλαδή, οι συγκεντρώσεις καρνιτίνης που αποβάλλονται στα ούρα είναι πολύ μικρές. Η επαναρρόφηση της καρνιτίνης γίνεται με ενεργητική μεταφορά στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάκια. (Rebouche and Paulson, 1986) Ακόμη και σε πρόωρα νεογνά με πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα, ή σε ασθενείς με συστηματική ανεπάρκεια καρνιτίνης, αποβάλλονται μικρά ποσά καρνιτίνης στα ούρα. Με βάση τα παραπάνω, είναι φανερό ότι κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, οι συγκεντρώσεις καρνιτίνης στο πλάσμα ρυθμίζονται - τουλάχιστον κατά ένα μέρος - από την επαναρρόφηση της καρνιτίνης από τους νεφρούς (Rebouche and Engel, 1980). Στην ομαλά εξελισσόμενη κύηση υπάρχει σταθερή απέκκριση καρνιτίνης παρά την παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων καρνιτίνης στο πλάσμα.

Λειτουργία του συστήματος της καρνιτίνης

Η παραγωγή ενέργειας στην καρδιά και τους σκελετικούς μυς βασίζεται κυρίως στην καύση των λι-

παρών οξέων. Ο καταβολισμός των λιπαρών οξέων μακράς αλυσού (long chain fatty acids, LCFA) αρχίζει με την ενεργοποίησή τους, δηλαδή τη μετατροπή τους σε LC-ακέτυλο-CoA. Το LC-ακέτυλο-CoA που σχηματίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο ή στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, δεν μπορεί να διέλθει μέσω της έσω μιτοχονδριακής μεμβράνης προκειμένου να φθάσει στη θέση όπου επιτελείται η β-οξειδωση. Η καρνιτίνη λοιπόν έχει σαν αποστολή, τη μεταφορά των ακυλ-ομάδων των λιπαρών οξέων κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Συγκεκριμένα, η ακυλο-ομάδα των λιπαρών οξέων μεταφέρεται μέσω του λιπο-ακυλο-CoA στο υδροξύλιο της καρνιτίνης. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την ακυλτρανσφεράση της καρνιτίνης I (carnitine acyltransferase I, CAT I). Δεδομένου ότι το γλυκαγόνο του ήπατος εξαντλείται μέσα σε λίγες ώρες μετά από τη λήψη της τροφής, η β-οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων καθίσταται η κύρια πηγή ενέργειας για το ήπαρ, την καρδιά και τους σκελετικούς μυς (Bartlett and Eaton, 2004). Σε έναν ενήλικα, μετά από 24 ώρες νηστείας το 80% της ενέργειας παράγεται από την οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Με αυτό το μηχανισμό διατηρούνται σε ικανοποιητικά επίπεδα οι συγκεντρώσεις γλυκόζης στο πλάσμα, ενισχύεται η νεογλυκογένεση και ο μεγαλύτερος όγκος του σώματος καταναλώνει εναλλακτικές πηγές ενέργειας, ούτως ώστε ο εγκέφαλος να τροφοδοτείται με γλυκόζη (Bartlett and Eaton, 2004).

Έλλειψη καρνιτίνης

Η έλλειψη της καρνιτίνης (Πίνακας 1), διακρίνεται σε δύο κατηγορίες:

- Κληρονομική
- Επίκτητη

Η κληρονομική έλλειψη καρνιτίνης χωρίζεται σε δύο κλινικές οντότητες:

- Συστηματική πρωτοπαθής έλλειψη καρνιτίνης
- Πρωτοπαθής μυϊκή έλλειψη καρνιτίνης

Στην πρώτη περίπτωση, η διάγνωση τίθεται με μέτρηση όλων των κλασμάτων καρνιτίνης στο αίμα ή σε ούρα 24ώρου, ενώ στη δεύτερη με βιοψία μυός. Η πρωτοπαθής συστηματική έλλειψη καρνιτίνης μπορεί να οφείλεται σε:

1. Διαταραχή στη σύνθεση της καρνιτίνης
2. Διαταραχές της ομοιόστασης της καρνιτίνης στο επίπεδο του νεφρού
3. Διαταραχές των μηχανισμών μεταφοράς της καρνιτίνης στο επίπεδο του κυττάρου, που επηρεάζουν την πρόσληψη ή την απελευθέρωσή της από τους ιστούς

4. Μεγάλου βαθμού αποδόμηση καρνιτίνης

5. Διαταραχή της απορρόφησης της καρνιτίνης από το έντερο.

Η πρωτοπαθής συστηματική έλλειψη καρνιτίνης σχετίζεται με υποτροπιάζοντα επεισόδια μεταβολικής εγκεφαλοπάθειας, υπογλυκαιμία, υποπροθρομβιναιμία, υπεραμμωναιμία και αυξημένο κορεσμό των ηπατοκυττάρων σε λίπη κατά τη διάρκεια των οξέων επεισοδίων.

Το αποτέλεσμα της πρωτοπαθούς μυϊκής έλλειψης της καρνιτίνης είναι η συσσώρευση λιπών στο μυοκάρδιο και στους σκελετικούς μυς, με προοδευτικά αυξανόμενη και τελικά ποικίλου βαθμού μυϊκή αδυναμία, υποτονία και μυόλυση, καθώς επίσης και η συσσώρευση λιπών στο ήπαρ, με εκδηλώσεις όπως υποκετοναίμια, υπογλυκαιμία, υπεραμμωναιμία και χαμηλό βάρος σώματος (Colberg et al., 1995; Kim et al., 2000).

Γενικά, θα πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν, ότι η συστηματική έλλειψη καρνιτίνης είναι ένα ιδιαίτερα ετερογενές σύνδρομο και ο χρόνος εμφάνισης ή αναγνώρισής της ποικίλλει.

Η επίκτητη έλλειψη καρνιτίνης μπορεί να οφείλεται σε ανεπαρκή πρόσληψη, αυξημένες απαιτήσεις, ή μεγάλη απώλεια καρνιτίνης. Αποτελεί μέρος γενετικών συνδρόμων του διάμεσου μεταβολισμού, ή επίκτητων διαταραχών, με τις δύο ακόλουθες κύριες κατηγορίες:

- Οργανικές οξυουρίες
- Νεφροπάθειες

Συνήθως, στην επίκτητη έλλειψη καρνιτίνης, οι εκδηλώσεις αφορούν λειτουργικές ανεπάρκειες οργάνων και ανάλογα με το όργανο επηρεάζεται και συγκεκριμένη μεταβολική οδός.

Σκοπός της μελέτης

Το φαινόμενο της ελάττωσης των επιπέδων της καρνιτίνης κατά τη διάρκεια της κύησης σε τόσο μεγάλο βαθμό, ώστε να συγκρίνεται με τα επίπεδα του συνδρόμου ανεπάρκειας της καρνιτίνης, χωρίς όμως να έχει σαν επακόλουθο την εμφάνιση συμπτωμάτων, δεν έχει διερευνηθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Επαρκής εξήγηση στο φαινόμενο της ανεπάρκειας της καρνιτίνης δεν είναι δυνατόν να δοθεί, δεδομένου ότι ακόμη δεν έχει προσδιοριστεί η κατανομή της καρνιτίνης στο πλάσμα, το αμνιακό υγρό και τα ούρα των εγκύων γυναικών. Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί διεξοδικά η βιοσύνθεση της καρνιτίνης στις έγκυες γυναίκες. Με βάση την τρέ-

χουσα βιβλιογραφία και τα αναπάντητα ερωτήματα του πεδίου, η παρούσα μελέτη έχει σαν σκοπό να διερευνηθούν τα ακόλουθα θέματα: Α) Μελέτη της βιοσύνθεσης της καρνιτίνης. Αναλυτικά:

1. Μέτρηση λυσίνης, μεθειονίνης, αλανίνης στο μητρικό πλάσμα.
2. Μέτρηση 4-N-trimethylaminobutyrate, 3-hydroxy-6-N-trimethyllysine, 6-N-trimethyllysine στο μητρικό πλάσμα, στο πλάσμα της ομφαλικής αρτηρίας και φλέβας, στο αμνιακό υγρό και στα ούρα των εγκύων γυναικών.
3. Κατανομή των εστέρων της καρνιτίνης στα αντίστοιχα βιολογικά υγρά.

Β) Μελέτη της αποθήκευσης της καρνιτίνης στο σώμα της υγιούς εγκύου και την εμβρυοπλακουντιακή μονάδα. Μέτρηση καρνιτίνης στους ακόλουθους ιστούς:

1. μητρικό πλάσμα
2. μητρικά ούρα
3. ομφαλικό πλάσμα
4. αμνιακό υγρό

Υλικό και Μέθοδοι

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη στο Νοσοκομείο «Αλεξάνδρα», στην Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Διευθυντή, Καθηγητή κυρίου Αριστεΐδη Αντσακλή, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας με Διευθυντή τον Καθηγητή κύριο Νικόλαο Ανάγνου.

Συμμετείχαν 20 υγιείς έγκυες γυναίκες, με φυσιολογική πορεία κύησης και καμία γνωστή γενικότερη παθολογία, οι οποίες αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης και 20 υγιείς γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας, οι οποίες αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου. Στην ομάδα ελέγχου συμπεριλήφθησαν γυναίκες που εισήχθησαν στο Νοσοκομείο για να χειρουργηθούν για καλόηθες μη μεταβολικό νόσημα (π.χ. ινομώματα μήτρας), στις οποίες δεν είχε διαπιστωθεί κάποια παθολογία, τόσο από το ατομικό αναμνηστικό, όσο και από τον προεγχειρητικό έλεγχο.

Οι γυναίκες και των δύο ομάδων ήταν απόλυτα υγιείς. Για τη διασφάλιση αυτής της προϋπόθεσης γινόταν λεπτομερής λήψη ιστορικού, έλεγχος της λειτουργίας του θυρεοειδούς αδένος με μέτρηση TSH, T3, T4, FT4, έλεγχος μικροβιακών λοιμώξεων με μέτρηση CRP, καθώς και πλήρους βιοχημικός έλεγχος. Οι γυναίκες δεν λάμβαναν φάρμακα εκτός από σίδηρο, φολικό οξύ και ασβέστιο (οι έγκυες της ομάδας μελέτης). Οι αιμοληψίες γίνονταν μετά από 8 ώρες νηστεία και χωρίς να έχει προηγηθεί

έντονη σωματική δραστηριότητα.

Οι εξετάσεις ρουτίνας που αφορούσαν στα αιματολογικά (γενική αίματος), στα απλά βιοχημικά (ουρία, χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL, LDL, ουρικό οξύ) και στον ορμονολογικό έλεγχο του θυρεοειδούς αδένος (TSH, T3, T4, FT4) έγιναν στο νοσοκομείο «Αλεξάνδρα». Οι μετρήσεις του γλυκαγόνου ολοκληρώθηκαν στο Εργαστήριο Πυρηνικής Ιατρικής του Λαϊκού νοσοκομείου Αθηνών. Τα δείγματα για τη μέτρηση της καρνιτίνης μετά από την αρχική επεξεργασία, μελετήθηκαν στο Εργαστήριο Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Τα ακόλουθα μόρια: 4-N-trimethylaminobutyrate (βουτυροβεταΐνη), L-καρνιτίνη, 3-υδροξυ-6-N-τριμεθυλλυσίνη (HTML) και 6-N-τριμεθυλλυσίνη (TML) υπολογίστηκαν στο πλάσμα του μητρικού αίματος, του αίματος της ομφαλικής αρτηρίας και του αίματος της ομφαλικής φλέβας. Τα ίδια μόρια μετρήθηκαν στα δείγματα του αμνιακού υγρού καθώς και στα μητρικά ούρα. Στα μητρικά ούρα υπολογίστηκαν οι τιμές της κρεατινίνης καθώς και ο λόγος των μετρηθέντων μορίων προς αυτήν.

Επίσης μετρήθηκαν τα παρακάτω μόρια της ακυλ-καρνιτίνης στο πλάσμα από το μητρικό αίμα, το αίμα της ομφαλικής αρτηρίας και το αίμα της ομφαλικής φλέβας: C0, C2, C3, C4, C5:1, C5, C4-3OH, C6, C5OH, C8, C3DC, C10:1, C10, C4DC, C5DC, C12:1, C12, C6DC, C12:1OH, C12OH, C5M3OH DC, C14:2, C14:1, C14, C8DC, C14:1OH, C14OH, C16:1, C16, C10DC, C16:1OH, C16OH, C18:2, C18:1, C18, C18:2OH, C18:1OH, C18OH.

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε, αποτελεί ουσιαστικά τροποποίηση της τεχνικής των Schulze, (2003) και Cho (2006) (Schulze et al., 2003; Cho et al., 2006). Προετοιμασία δειγμάτων: Δείγματα αίματος συλλέχθησαν σε σωληνάκια με EDTA και αποθηκεύθηκαν στους -80°C. Δέκα μικρόλιτρα από κάθε δείγμα πλάσματος ενσταλάζονται πάνω σε διηθητικό χαρτί (Schleicher & Schuell 2992, Dassel, Germany) το οποίο αποξηραίνεται για 2 ώρες. Η εναπομένουσα κηλίδα κόβεται με ακρίβεια και τοποθετείται σε σωληνάριο Eppendorf. Προστίθενται 200μl μεθανόλης που περιέχουν 0,76 μM 2H3-καρνιτίνη, 0,04 μM 2H3-προπιονυλκαρνιτίνη, 0,04 μM 2H3-οκτανουλκαρνιτίνη και 0,08 μM 2H3-παλμιτουλκαρνιτίνη ως εσωτερικά controls. Τα μείγματα ανακινούνται για 20 λεπτά και το εκχύλισμα μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο και αποξηραίνεται στους 40°C υπό ρεύμα αζώτου. Αναμιγνύονται 100μl i-βουτανολ-HCl στο κάθε δείγμα και επωάζονται για 15 λεπτά, ανακινούμενα στους

Πίνακας 1. Αιτίες έλλειψης καρνιτίνης

Γενετικό έλλειμμα στη σύνθεση καρνιτίνης

Διατροφική έλλειψη λυσίνης ή μεθειονίνης ή έλλειψη άλλων παραγόντων, όπως ο σίδηρος

Δυσασπορόφηση καρνιτίνης από το πεπτικό

Αυξημένη απώλεια καρνιτίνης λόγω αυξημένου καταβολισμού ή βλάβης στη σωληναριακή επαναρόφηση ή λόγω γενετικής διαταραχής

Διαταραχή στη μεταφορά της καρνιτίνης από τον τόπο σύνθεσης στους ιστούς όπου χρησιμοποιείται

Νοσήματα: κίρρωση ήπατος, χρόνια νεφρική νόσος, οργανικές οξυουρίες, νόσος του Alzheimer, σηψαιμία, καρκίνος, καχεξία, χειρουργική επέμβαση, τραύμα, έγκλημα, θερμοπληξία, ισχαιμία μυοκαρδίου, AIDS, σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, αιμοκάθαρση και νεφροπάθεια

Σακχαρώδης διαβήτης

Φυσιολογική γήρανση

Κύηση

Έντονη φυσική άσκηση

Αυξημένες απαιτήσεις καρνιτίνης λόγω δίαιτας υψηλής σε λιπαρά οξέα, φαρμάκων (βαλπροϊκό οξύ, σαλικυλικό οξύ) και μεταβολικό stress

65°C. Η περίσσεια βουτανολ-HCl απομακρύνεται με εξάτμιση στους 40°C υπό ρεύμα αζώπου και τα προϊόντα των εστέρων καρνιτίνης διαλύονται σε 100 μL διαλύματος ακετονιτριλίου: ύδωρ (80:20 v:v%). Η διαδικασία αυτή καταλήγει στη μετατροπή μιας μικρής ποσότητας C2-καρνιτίνης σε ελεύθερη καρνιτίνη, που μπορεί να οδηγήσει σε τεχνητή αύξηση των επιπέδων της. Μια συσκευή Waters 2795 HPLC (Waters Corp., Milford, MA) χρησιμοποιήθηκε για την παροχή του διαλύτη, αποδίδοντας 0.1 mL/min ρεύμα ακετονιτριλίου: ύδατος (80:20 v:v%). Εγχύονταν 10μl δείγματος στη ροή σε μεσοδιαστήματα 4 λεπτών. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε μια συσκευή φασματομετρίας μάζας (Micromass Quattro Ultima Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometer Instrument, Waters Corp). Για νεφελοποίηση και διάλυση χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο, ενώ αργό χρησιμοποιήθηκε ως αέριο πρόσκρουσης. Η μέθοδος ανάλυσης περιελάμβανε 78 πλήρεις ανιχνεύσεις με την MS1 ανιχνευση μοριακών μαζών 200 και 550 Da, και την MS3 προσαρμοσμένη στην ιονική μάζα των 85 Da. Η ιδανική τάση του κώνου και η ενέργεια πρόσκρουσης ήταν 55 V και 26 eV, αντίστοιχα.

Στατιστική ανάλυση

Οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη βιολογικών παραμέτρων για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα εγκύων εκφράστηκαν ως μέσες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις. Οι συγκρίσεις των μέσων τιμών των παραμέτρων ανάμεσα στις δύο ομάδες πραγματο-

ποιήθηκαν με το στατιστικό t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Οι συγκρίσεις των μέσων τιμών των παραμέτρων για την ίδια ομάδα, για δείγματα από διαφορετικές θέσεις, πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό t-test για εξαρτημένα δείγματα. Οι συσχετίσεις ανάμεσα σε διαφορετικές παραμέτρους για την κάθε ομάδα ξεχωριστά, πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό τεστ του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson (Pearson's linear correlation coefficient). Πραγματοποιήθηκαν επίσης και αναλύσεις πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (multiple linear regression - MLR). Οι συγκρίσεις των κατανομών των συγκεντρώσεων των κλασμάτων της καρνιτίνης έγιναν με τον έλεγχο x². Τέλος, για τον έλεγχο της επίδρασης της ουρίας στη συγκέντρωση της L-καρνιτίνης πραγματοποιήθηκε η διαδικασία MANOVA, με παράγοντα την ομάδα και συμμεταβλητή τη συγκέντρωση της ουρίας. Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε στο 0,05.

Αποτελέσματα

Η μέση ηλικία στην ομάδα ελέγχου (20 γυναίκες) είναι 33,3±6,1 έτη, ενώ στην ομάδα εγκύων (20 γυναίκες) είναι 31,3±5,6 έτη. Η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Όσο αφορά στις μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις από τις παραμέτρους που μετρήθηκαν στα σύρα για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα εγκύων, ο έλεγχος t-test για ανεξάρτητα δείγματα έδειξε ότι η ομάδα των εγκύων είχε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες μέσες τιμές από την ομάδα ελέγχου στις

ακόλουθες παραμέτρους: Butyrobetaine, L-καρνιτίνη, Creatinine και L-carnitine creat ενώ είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές στην 3-Hydroxy-6-N-trimethyllysine. Όσο αφορά στις μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις από τις παραμέτρους που μετρήθηκαν στο αίμα για την ομάδα ελέγχου και την ομάδα εγκύων, ο έλεγχος t-test για ανεξάρτητα δείγματα έδειξε ότι η ομάδα των εγκύων είχε στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες μέσες τιμές από την ομάδα ελέγχου στις ακόλουθες παραμέτρους: Butyrobetaine και L-καρνιτίνη.

Τόσο στα ούρα, όσο και στο αίμα, οι μέσες τιμές της L-καρνιτίνης και του πρόδρομου μορίου της Butyrobetaine ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με την ομάδα των εγκύων. Το ίδιο ισχύει όμως και για το λόγο των δύο συγκεντρώσεων. Η μέση τιμή του λόγου της συγκεντρώσεως της L-καρνιτίνης στα ούρα προς τη συγκεντρώση της L-καρνιτίνης στο αίμα για την ομάδα ελέγχου ήταν $20,8 \pm 14,5$. Αντίθετα, για την ομάδα των εγκύων η μέση τιμή του λόγου αυτού ήταν μόνο $7,0 \pm 7,8$ και ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερη από την αντίστοιχη για την ομάδα ελέγχου (t-test, $p < 0,01$). Τέλος, η διαδικασία MANOVA απέδειξε ότι η σημαντική διαφοροποίηση των μέσων τιμών της L-καρνιτίνης, τόσο στα ούρα όσο και στο αίμα, ανάμεσα στις έγκυες γυναίκες και τις γυναίκες της ομάδας ελέγχου ήταν ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση της ουρίας στο αίμα. Όσον αφορά στο μητρικό αίμα υπάρχει μια σημαντική ομάδα κλασμάτων (C0, C2, C16, C18_2, C18, C18), όπου οι μέσες τιμές στην ομάδα ελέγχου ήταν σημαντικά υψηλότερες από τις αντίστοιχες στην ομάδα των εγκύων.

Συσχετίσεις

Όταν υπάρχει θετική συσχέτιση σημαίνει ότι η αύξηση της μιας παραμέτρου συνεπάγεται αύξηση και της δεύτερης παραμέτρου. Αντίθετα όταν υπάρχει αρνητική συσχέτιση σημαίνει ότι η αύξηση της μιας παραμέτρου συνεπάγεται μείωση της δεύτερης παραμέτρου. Οι συσχετίσεις είναι στατιστικά σημαντικές στο επίπεδο 0,01.

Οι τιμές της L-καρνιτίνης στο μητρικό αίμα, αμνιακό υγρό και μητρικά ούρα ήταν υψηλές. Ιδιαίτερα η συσχέτιση ανάμεσα στο αμνιακό υγρό και τα μητρικά ούρα ήταν εξαιρετική ($r=0,900$). Οι συσχετίσεις του Γλυκαγόνου με L-καρνιτίνη στην ομάδα ελέγχου στο αίμα και στα ούρα ήταν αρνητικές και όχι ιδιαίτερα υψηλές. Στην ομάδα εγκύων οι συσχετίσεις ήταν υψηλότερες αλλά ήταν θετικές. Αντίθετα, στο αμνιακό υγρό των εγκύων η συσχέτι-

ση ήταν αρνητική και στατιστικά σημαντική. Οι συσχετίσεις του κλάσματος (Glu/C-peptide) με L-καρνιτίνη για την ομάδα ελέγχου στο αίμα και στα ούρα ήταν αρνητικές αλλά πολύ χαμηλές. Στην ομάδα εγκύων οι συσχετίσεις ήταν και πάλι αρνητικές, αλλά σημαντικά υψηλότερες, ιδιαίτερα στο μητρικό αίμα. Οι συσχετίσεις της συγκέντρωσης της L-καρνιτίνης στο μητρικό αίμα με τις συγκεντρώσεις διαφορετικών κλασμάτων στην ομάδα ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντικές μόνο για το κλάσμα C16_1OH, ενώ στην ομάδα εγκύων ήταν στατιστικά σημαντικές για μια σειρά από κλάσματα (C16, C18_2, C18 και C18_2OH). Οι συσχετίσεις του κλάσματος C0 ήταν θετικές και στατιστικά σημαντικές, εκτός από τις περιπτώσεις της συσχέτισης ανάμεσα στο αμνιακό υγρό και στην ομφαλική αρτηρία, καθώς και ανάμεσα στην ομφαλική φλέβα και στην ομφαλική αρτηρία.

Συζήτηση-Συμπεράσματα

Το φαινόμενο της ελάττωσης των επιπέδων της καρνιτίνης στο αίμα, κατά τη διάρκεια της κύησης, δεν έχει διερευνηθεί πλήρως μέχρι σήμερα. Δεν είναι επίσης γνωστό γιατί αυτή η σημαντική ελάττωση, ανάλογη με τα αντίστοιχα επίπεδα που εμφανίζονται στο σύνδρομο ανεπάρκειας της καρνιτίνης, δεν έχει σαν επακόλουθο την εμφάνιση συμπτωμάτων. Ο κύριος λόγος της μη πλήρους διερεύνησης του φαινομένου αυτού είναι το ότι δεν έχει προσδιοριστεί η συγκέντρωση της καρνιτίνης στο μυϊκό ιστό (όπου περιέχεται το 90% της συνολικής καρνιτίνης του σώματος), στο πλάσμα, στο αμνιακό υγρό, στην ομφαλική κυκλοφορία καθώς και στα ούρα των εγκύων γυναικών. Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς η βιοσύνθεση της καρνιτίνης στις έγκυες γυναίκες. Η παρούσα μελέτη αποσαφηνίζει μέρος του φαινομένου. Η ολική καρνιτίνη του πλάσματος μειώνεται προοδευτικά κατά τη διάρκεια της κύησης και φθάνει στα επίπεδα ασθενών με έλλειψη καρνιτίνης. (Treem et al., 1988; Bartlett 1993; Ricciolini et al., 2001; Gunter et al., 2002) Ήδη, από την αρχική μελέτη του φαινομένου από τον Cederblad, αναφέρεται προοδευτική μείωση της ελεύθερης καρνιτίνης από την έναρξη της κύησης. Στις τελειόμηνες κυήσεις, παράλληλα με την ολική καρνιτίνη, μειώνεται και η ελεύθερη καρνιτίνη, ώστε τελικά και οι δύο μορφές φτάνουν περίπου στο 50% της συγκέντρωσης που συναντάται στο πλάσμα των μη εγκύων γυναικών (Bargen-Lockner et al., 1981; Bartlett, 1993). Η μείωση αυτή είναι μεγαλύτερη στο πρώτο ήμισυ της κύησης σε σύγκριση

με αυτήν μετά την 20η εβδομάδα κύησης. Η μείωση αυτή που παρατηρήθηκε δεν ήταν ανάλογη της αύξησης του βάρους του εμβρύου. Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η μείωση της καρνιτίνης οφείλεται σε άλλους παράγοντες.

Θα πρέπει να τονισθεί ότι η αύξηση του όγκου του πλάσματος που παρατηρείται κατά την κύηση και οδηγεί σε αιμοαραίωση, δεν επαρκεί για να εξηγηθεί η μεγάλη αυτή μείωση της καρνιτίνης στο πρώτο ήμισυ της κύησης (Scholte et al., 1978). Μάλιστα, η σημαντική διαφοροποίηση των μέσων τιμών της L-καρνιτίνης τόσο στα ούρα όσο και στο αίμα, ανάμεσα στις έγκυες γυναίκες και στις γυναίκες της ομάδας ελέγχου, είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση της ουρίας στο αίμα. Επομένως, οι χαμηλές τιμές καρνιτίνης στις έγκυες δεν μπορούν να συσχετιστούν με τη νεφρική λειτουργία και δεδομένου ότι είναι γνωστό πως η απέκκριση καρνιτίνης είναι αυξημένη στα ούρα εγκύων (παρά τα χαμηλά επίπεδα πλάσματος), δεν επιβεβαιώνεται η άποψη περί αυξημένης παραγωγής καρνιτίνης από τους νεφρούς εγκύων (Scholte et al., 1978).

Η ακυλ-καρνιτίνη μειώνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, αλλά όχι σε τόσο χαμηλά επίπεδα ούτε με τόσο ταχύ ρυθμό όσο η ελεύθερη καρνιτίνη (Cederblad et al., 1986; Talian et al., 2007). Υπάρχουν ερευνητές που αναφέρουν ότι μόνο η ελεύθερη καρνιτίνη μειώνεται, ενώ τα επίπεδα της ακυλ-καρνιτίνης αυξάνονται (Borum, 1986). Η αύξηση της οξειδωσης των λιπαρών οξέων, που συμβαίνει προς το τέλος της κύησης, μπορεί να έχει σχέση με τη μείωση αυτή και την μετατροπή της ελεύθερης καρνιτίνης σε ακυλ-καρνιτίνη (Borum, 1986; Winter et al., 1995).

Μελέτες του Schoderbeck (1995), επιβεβαίωσαν ότι η κύηση προκαλεί δευτεροπαθή έλλειψη καρνιτίνης, όμως σε αυτές τα επίπεδα της ακυλ-καρνιτίνης δεν μεταβάλλονται ιδιαίτερα. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις συγκεντρώσεις, μετά από την 12η εβδομάδα της κύησης και μέχρι τον τοκετό (Winter et al., 1995).

Η απέκκριση της ολικής καρνιτίνης στα ούρα δεν διαφέρει στις τελειόμηνες εγκύους, σε σύγκριση με τις μη έγκυες γυναίκες, παρά τα χαμηλά επίπεδα καρνιτίνης στο πλάσμα των εγκύων γυναικών. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αλλαγές του μηχανισμού ομοιόστασης και όχι στην αυξημένη σύνθεση της καρνιτίνης στο νεφρό (Scholte et al., 1978). Τελικά, η ολική καρνιτίνη που είναι αποθηκευμένη στον οργανισμό δεν φαίνεται να μεταβάλλεται. Η απέκκριση όμως της ακυλ-καρνιτίνης είναι υψηλότερη σε σχέση με αυτή της ελεύθερης καρνιτίνης

στις έγκυες, σε σύγκριση με τις μη έγκυες γυναίκες, και φθάνει στο μέγιστο την 16η εβδομάδα. Το φαινόμενο αυτό, πιθανά, να βοηθά στην αποβολή της περίσσειας των τοξικών ακυλ-ομάδων από τα κύτταρα, προκειμένου να αποφευχθεί η κυτταρόλυση και ο κυτταρικός θάνατος, ή μια πιθανή συστηματική οξέωση. Αν αυτή η υπόθεση είναι αληθής, τότε δικαιολογείται η μείωση της ελεύθερης καρνιτίνης στο πλάσμα και η αύξηση της κάθαρσης της ακυλ-καρνιτίνης στη διάρκεια της κύησης (Scholte et al., 1978). Η αυξημένη απέκκριση ακυλ-καρνιτίνης στα ούρα, οι ορμονικές μεταβολές και η μείωση της βιοσύνθεσης της καρνιτίνης στις έγκυες γυναίκες έχουν σαν τελικό αποτέλεσμα την έλλειψή της κατά τη διάρκεια της κύησης. Τέλος, τα επίπεδα της καρνιτίνης μειώνονται περαιτέρω, τόσο κατά τη διάρκεια του τοκετού όσο και μετά τον τοκετό και επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα μετά το τέλος της λοχείας (Marzo et al., 1994).

Η καρνιτίνη, σε περίοδο κύησης, παράγεται από τον πλακούντα αλλά και διέρχεται ενεργητικά μέσω αυτού (Oey et al., 2006). Ο μηχανισμός, μέσω του οποίου παρέχεται καρνιτίνη στο έμβryo, μερικώς μέσω του πλακούντα, δεν είναι απόλυτα γνωστός. Είναι τεκμηριωμένο ότι το έμβryo διαθέτει περιορισμένη δυνατότητα σύνθεσης καρνιτίνης. Οι συγκεντρώσεις της στο αμνιακό υγρό και στο έμβryo, το οποίο μπορεί να συνθέσει κάποιες περιορισμένες ποσότητες καρνιτίνης στο νεφρό, στο ήπαρ και στο νωτιαίο μυελό, είναι υψηλότερες από ό,τι στο μητρικό πλάσμα (Rebouche et al., 2001; Oey et al., 2006). Τονίζεται ότι, για την παραγωγή ενέργειας, το έμβryo χρησιμοποιεί τους υδατάνθρακες (Cederblad et al., 1986). Προς το τέλος της κύησης αποθηκεύει καρνιτίνη στους μυς του, έτσι ώστε τα επίπεδα αυτά της καρνιτίνης να είναι παρόμοια με αυτά ενός ενηλίκου. Αυτό, γιατί η διαθεσιμότητα της καρνιτίνης είναι σημαντική για το νεογνό μετά τη γέννησή του, καθώς ο καταβολισμός των λιπιδίων εξελίσσεται σε κύρια πηγή ενέργειας. Έτσι, έχουμε μετάβαση από την ενεργειακή οδό της οξειδωσης της γλυκόζης, σε αυτήν της οξειδωσης των λιπαρών οξέων (Wolf et al., 1974).

Αντίθετα, τα πρόωρα νεογνά δεν επιτυγχάνουν να συγκεντρώσουν επαρκή ποσότητα καρνιτίνης (Hahn, 1981; Shenai and Borum, 1984). Η φυσιολογική ενδομήτρια ανάπτυξη, όπως είναι γνωστό, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την επαρκή οξυγόνωση του εμβρύου. Νεογνά με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη φαίνεται πως παρουσιάζουν μειωμένη αξιοποίηση και οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και τριγλυκεριδίων (Akisu et al.,

2001). Η παρατήρηση ότι στα τελειόμηνα νεογνά με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη εμφανίζεται σημαντική μείωση της ελεύθερης καρνιτίνης του πλάσματός τους, πιθανά συνδέει την ανεπάρκειά της κατά την κύηση με τις διαταραχές της ενδομήτριας ανάπτυξης (Schulpis et al., 2008). Κατά την αποκλειστική παρεντερική σίτιση σε πρόωρα νεογνά, η καρνιτίνη του πλάσματος καθώς και η πρόσληψή της από τους ιστούς, μειώνεται (Schmidt-Sommerfeld and Penn, 1990). Έτσι, η άμεση έναρξη συμπληρωματικής χορήγησης καρνιτίνης, είτε από την εντερική οδό, είτε παρεντερικά στα πρόωρα νεογνά, έχει θετικό αντίκτυπο στις αποθήκες καρνιτίνης, στο χρόνο εναφροράς του βάρους γέννησής τους, καθώς και στην αναπνευστική τους λειτουργία (Crill et al., 2006; Crill et al., 2006; Donnelly et al., 2007).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι από τον έλεγχο των επιπέδων καρνιτίνης στο αίμα νεογνών, προέκυψε και η δυνατότητα εντοπισμού των μητέρων που παρουσίαζαν συστηματική πρωτοπαθή ανεπάρκεια καρνιτίνης, μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή του γονιδίου SLC22A5. Η πάθηση αυτή εκδηλώνεται συνήθως στην παιδική ηλικία με μεταβολικές διαταραχές και μυοκαρδιοπάθεια. (El-Hattab et al., 2010; Khalid et al., 2010)

Όσον αφορά την εμβρυϊκή κυκλοφορία, στο αίμα του ομφαλίου λώρου παρατηρούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις ελεύθερης καρνιτίνης σε πρόωρα νεογνά και μικρότερες συγκεντρώσεις σε τελειόμηνα νεογνά, σε σύγκριση με τις συγκεντρώσεις καρνιτίνης στο πλάσμα τους (Carroll et al., 1981; Shenai and Borum, 1984; Schmidt-Sommerfeld et al., 1985). Επίσης, η ελεύθερη καρνιτίνη και η ακυλ-καρνιτίνη στο αίμα του ομφαλίου λώρου ευρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, απ' ότι στο μητρικό πλάσμα (Cederblad et al., 1986; Talian et al., 2007). Αυτό επιβεβαιώνει, ότι το έμβρυο συνθέτει καρνιτίνη, ότι ο πλακούντας μπορεί να συνθέτει καρνιτίνη και ότι η μεταφορά καρνιτίνης από το έμβρυο στη μητέρα γίνεται τουλάχιστον με βραδύτερους ρυθμούς απ' ότι το αντίστροφο (Bartlett, 1993).

Αναλύοντας τα επιμέρους αποτελέσματα της μελέτης μας, τόσο στα ούρα, όσο και στο αίμα, οι μέσες τιμές της L-καρνιτίνης και του προδρομικού μορίου της βουτυροβεταΐνης, είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στην ομάδα ελέγχου, σε σύγκριση με την ομάδα των εγκύων. Να σημειωθεί ότι, θετική συσχέτιση έχει διαπιστωθεί μεταξύ των συγκεντρώσεων βουτυροβεταΐνης και καρνιτίνης - δεδομένου ότι η πρώτη ουσία είναι προδρομικό μόριο της σύνθεσης της άλλης - ενώ δεν έχει παρατηρηθεί στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ καρνιτίνης και άλλων

στοιχείων, όπως ο σίδηρος του ορού (Ringseis et al., 2010; Keller et al., 2009).

Η μελέτη μας επιβεβαιώνει για πρώτη φορά, ότι συγκεκριμένα (C0, C2, C16, C18:2, C18) και όχι όλα τα κλάσματα της καρνιτίνης, παρουσιάζονται μειωμένα στο μητρικό αίμα της ομάδας των εγκύων, σε σύγκριση με το αίμα της ομάδας ελέγχου (Talian et al., 2007). Μια τέτοια παρατήρηση, πιθανά, υποδηλώνει τα κλάσματα καρνιτίνης που δεσμεύει το έμβρυο, λόγω αδυναμίας σύνθεσής τους.

Συσχετίζοντας τις τιμές καρνιτίνης μεταξύ μητρικού αίματος, ούρων και αμνιακού υγρού, βρέθηκε υψηλού βαθμού αλληλεπίδραση, υποδηλώνοντας την ελεύθερη διακίνηση της καρνιτίνης προς το αμνιακό υγρό και την απρόσκοπτη απέκκρισή της στα ούρα, παρά τα χαμηλά της επίπεδα στο πλάσμα. Ελέγχοντας μάλιστα τις τιμές της καρνιτίνης στο μητρικό αίμα, με τις συγκεντρώσεις των διαφορετικών κλασμάτων της στην ομάδα των εγκύων, μόνο ορισμένα από αυτά δίνουν θετική συσχέτιση. Επιβεβαιώνεται έτσι, ότι συγκεκριμένα κλάσματα καρνιτίνης «δρουν» ανεξάρτητα από την ολική καρνιτίνη, πιθανά γιατί αυτά χρησιμοποιούνται από το έμβρυο (C16_1, C10DC, C16_1OH, C16OH, C18_1, C18_1OH, C18OH).

Συμπερασματικά, η μελέτη μας διαφαίνεται περαιτέρω την παθοφυσιολογία του φαινομένου της χαμηλής συγκέντρωσης καρνιτίνης στην κύηση. Επιβεβαιώνονται τα χαμηλά επίπεδα καρνιτίνης όχι μόνο στο μητρικό αίμα αλλά και στο αμνιακό υγρό και στα ούρα των εγκύων γυναικών, ανεξάρτητα από το επίπεδο της νεφρικής τους λειτουργίας, ενώ φαίνεται πως δεν ακολουθούν όλα τα κλάσματα καρνιτίνης τις ίδιες διακυμάνσεις συγκέντρωσης. Ορισμένα μόνο κλάσματα καρνιτίνης είναι μειωμένα στις έγκυες, πιθανά, υποδηλώνοντας τις ανάγκες του εμβρύου. Η μείωση της ελεύθερης καρνιτίνης στην έγκυο μπορεί να αντανάκλα τη μείωση του συνολικού επιπέδου της καρνιτίνης, ή κλασμάτων αυτής και την αύξηση της διαπλακουντιακής της προσφοράς. Μελλοντικές μετρήσεις καρνιτίνης και των κλασμάτων της στο μυϊκό ιστό, πιθανά, θα δώσουν τις οριστικές απαντήσεις στη φυσιολογία του φαινομένου, το οποίο μπορεί να μην έχει ιδιαίτερη κλινική σημασία στις τελειόμηνες κυήσεις, αλλά αποκτά ενδιαφέρον στις πρόωρες, λόγω της αδυναμίας του εμβρύου να συντηρήσει την ενεργειακή του ομοιόσταση. Έτσι, η εξωγενής χορήγηση τόσο της καρνιτίνης, όσο και συγκεκριμένων κλασμάτων αυτής, αποδεικνύεται ευεργετική, βελτιώνοντας το σωματικό βάρος και την αναπνευστική ικανότητα των πρόωρων νεογνών.

Ήδη, προχωρούμε στην επεξεργασία δειγμάτων ιστών εγκύων και μη εγκύων γυναικών, συμπεριλαμβανομένων μυϊκών ινών σκελετικού τύπου, μυομητρίου και πλακούντα. Η ερμηνεία των αποτελεσμάτων, αναμένεται να συμβάλει ουσιαστικά στην πλήρη κατανόηση του φαινομένου της συνολικής μεταβολής των επιπέδων της καρνιτίνης κατά τη διάρκεια της κύησης.

Investigation of carnitine deficiency and expression of the transporting proteins involved during normal gestation

Marinopoulos S.¹, Pappa K.¹, Drakakis P.¹, Anagnou N.², Antsaklis A.¹

¹ 1st Dept. of Obstetrics & Gynecology, University of Athens, Alexandra Hospital, Greece

² Biology Lab, Medical School, University of Athens, Greece

Correspondence: Marinopoulos Sp.

86 Vas. Sofias Av. and Lourou str., 115 28 Athens, Greece

Tel.: +30 210 6800480, +30 6944 383 601

E-mail: spyro@hol.gr

Summary

Introduction: Carnitine maintains a crucial role in the process of transporting long chain fatty acids, in order to oxidize and provide the human body with sufficient energy. Plasma carnitine deficiency presents as a metabolic disorder. **Aim:** During pregnancy, total plasma carnitine gradually decreases to the levels of patients with known carnitine deficiency, but without any clinical symptoms. **Aim of our study** was to thoroughly investigate carnitine biosynthesis in pregnant women. **Material and Methods:** Population of our prospective study consisted of healthy pregnant women (study group) and women of reproductive age who were surgically treated for a benign gynecological condition (control group). 4-N-trimethylaminobutyrate, L-carnitine, acyl-carnitines, 3-hydroxy-6-N-trimethyl-lysine (HTML) and 6-N-trimethyl-lysine (TML) were measured in maternal plasma, in arterial and venous blood from the umbilical cord, in amniotic fluid and maternal urine samples. **Results:** Values of L-carnitine and its precursor molecule 4-N-trimethylaminobutyrate were statistically significantly higher in both plasma

and urine samples of our control group. This suggests unrestricted transportation of total carnitine towards amniotic fluid and urine, despite its low plasma levels. **Conclusions:** Only specific carnitine fractions appear reduced in pregnancy, suggesting possible metabolic needs for those that the fetus is unable to compose. This is of great interest for premature neonates, for which supplementary carnitine fractions' administration is beneficial, improving fetal body weight and respiratory capacity.

Key words: carnitine deficiency, gestation

Βιβλιογραφία

- Akisu, M., Bekler C., et al. (2001) Free carnitine concentrations in cord blood in preterm and full-term infants with intrauterine growth retardation. *Pediatr. Int.* 43, 107-108.
- Bargen-Lockner, C., Hahn P., et al. (1981). Plasma carnitine in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 140, 412-414.
- Bartlett, K. (1993) Methods for the investigation of hypoglycaemia with particular reference to inherited disorders of mitochondrial beta-oxidation. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 7, 643-667.
- Bartlett, K. and Eaton S. (2004) Mitochondrial beta-oxidation. *Eur. J. Biochem.* 271, 462-469.
- Bohles, H., Evangelidou A., et al. (1994) Carnitine esters in metabolic disease. *Eur. J. Pediatr.* 153(7 Suppl 1), S57-61.
- Borum, P. R. (1986) In: Clinical aspects of human carnitine deficiency. New York, Pergamon Press. xv, pp. 271
- Carroll, J. E., Brooke, M. H. et al. (1981) Carnitine intake and excretion in neuromuscular diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 2693-2698.
- Cederblad, G., Fahraeus, L. et al. (1986) Plasma carnitine and renal-carnitine clearance during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 44, 379-383.
- Cho, S. H., Lee, J. et al. (2006) Direct determination of acylcarnitines in amniotic fluid by column-switching liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 1741-1746.
- Colberg, S. R., Simoneau J. A., et al. (1995) Skeletal muscle utilization of free fatty acids in women with visceral obesity. *J. Clin. Invest.* 95, 1846-1853.
- Crill, C. M., Christensen, M. L. et al. (2006) Relative bioavailability of carnitine supplementation in premature neonates. *J.PEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 30, 421-425.
- Crill, C. M., Storm M. C., et al. (2006) Carnitine supplementation in premature neonates: effect on plasma and red blood cell total carnitine concentrations, nutrition parameters and morbidity. *Clin. Nutr.* 25, 886-896.
- Donnelly, C. T., Hameed A. B., et al. (2007) Carnitine deficiency in pregnancy. *Obstet. Gynecol.* 110, 480-482.
- El-Hattab, A. W., Li, F. Y. et al. (2010) Maternal systemic primary carnitine deficiency uncovered by newborn screening: clinical, biochemical, and molecular aspects.

- Genet. Med. 12, 19-24.
- Engel, A. G., Rebouche, C. J. et al. (1981) Primary systemic carnitine deficiency. II. Renal handling of carnitine. *Neurology*, 31, 819-825.
- Frohlich, J., Secombe, D. W. et al. (1978) Effect of fasting on free and esterified carnitine levels in human serum and urine: correlation with serum levels of free fatty acids and beta-hydroxybutyrate. *Metabolism*, 27, 555-561.
- Gulewitsch W, K. R. (1905) Zur Kenntnis der extraktivstoffe der muskeln I. Mitteilung. Über das carnitine. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 45: 326.
- Gunter, H. H., Peulecke, W. et al. (2002) The concentration of carnitine in the last trimester of pregnancy subject to glucose tolerance. *Zentralbl. Gynakol.* 124, 533-537.
- Hahn, P. (1981) The development of carnitine synthesis from gamma-butyrobetaine in the rat. *Life Sci.* 28, 1057-1060.
- Keller, U., van der Wal, C. et al. (2009) Carnitine status of pregnant women: effect of carnitine supplementation and correlation between iron status and plasma carnitine concentration. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 1098-1105.
- Khalid, J. M., Oerton J., et al. (2010) Relationship of octanoylcarnitine concentrations to age at sampling in unaffected newborns screened for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin. Chem.* 56, 1015-1021.
- Kim, J. Y., Hickner, R. C. et al. (2000) Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E1039-1044.
- Koumantakis, E., Sifakis, S. et al. (2001) Plasma carnitine levels of pregnant adolescents in labor. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 14, 65-69.
- Marzo, A., Cardace, G. et al. (1994) Plasma concentration, urinary excretion and renal clearance of L-carnitine during pregnancy: a reversible secondary L-carnitine deficiency. *Gynecol. Endocrinol.* 8, 115-120.
- Oey, N. A., van Vlies, N. et al. (2006) L-carnitine is synthesized in the human fetal-placental unit: potential roles in placental and fetal metabolism. *Placenta*, 27, 841-846.
- Rebouche, C. In: Comparative aspects of carnitine biosynthesis in microorganisms and mammals with attentions to carnitine biosynthesis in man. Frenkel and Mc Garry.
- Rebouche, C. J. (1992) Carnitine function and requirements during the life cycle. *FASEB J.* 6, 3379-3386.
- Rebouche, C. J. and Engel A. G. (1980) Significance of renal gamma-butyrobetaine hydroxylase for carnitine biosynthesis in man. *J. Biol. Chem.* 255, 8700-8705.
- Rebouche, C. J. and Engel A. G. (1983) Carnitine metabolism and deficiency syndromes. *Mayo. Clin. Proc.* 58, 533-540.
- Rebouche, C. J. and Mack D. L. (1984) Sodium gradient-stimulated transport of L-carnitine into renal brush border membrane vesicles: kinetics, specificity, and regulation by dietary carnitine. *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 393-402.
- Rebouche, C. J. and Paulson D. J. (1986) Carnitine metabolism and function in humans. *Annu. Rev. Nutr.* 6, 41-66.
- Ricciolini, R., Scalibastri M., et al. (2001) The effect of pivalate treatment of pregnant rats on body mass and insulin levels in the adult offspring. *Life Sci.* 69, 1733-1738.
- Ringseis, R., Hanisch, N. et al. (2010) Low availability of carnitine precursors as a possible reason for the diminished plasma carnitine concentrations in pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth* 10, 17.
- Schmidt-Sommerfeld, E. and Penn D. (1990) Carnitine and total parenteral nutrition of the neonate. *Bio. Neonate* 58, Suppl 1, 81-88.
- Schmidt-Sommerfeld, E., Penn, D. et al. (1985) Carnitine in human perinatal fat metabolism. *J. Perinat. Med.* 13, 107-116.
- Scholte, H. R., Stinis, J. T. et al. (1978) Low carnitine levels in serum of pregnant women. *N. Engl. J. Med.* 299, 1079-1080.
- Schulpis, K. H., Papakonstantinou, E. D. et al. (2008) The effect of the mode of delivery on the maternal-neonatal carnitine blood levels and antioxidant status. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46, 680-686.
- Schulze, A., Schmidt, C. et al. (2003) Accurate measurement of free carnitine in dried blood spots by isotope-dilution electrospray tandem mass spectrometry without butylation. *Clin. Chim. Acta*, 335, 137-145.
- Secombe, D. W., Hahn, P. et al. (1978) The effect of diet and development on blood levels of free and esterified carnitine in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 483-489.
- Shenai, J. P. and Borum P. R. (1984) Tissue carnitine reserves of newborn infants. *Pediatr. Res.* 18, 679-682.
- Talian, G. C., Komlosi, K. et al. (2007) 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.* 62, 88-92.
- Tanphaichit, V. and Leelahagul P. (1993) Carnitine metabolism and human carnitine deficiency. *Nutrition*, 9, 246-254.
- Tomita M, S. Y. (1927) Über die oxyaminverbindungen welche die biuretreaktion zeigen. III. Spaltung der p-amino-b-oxy-buttersaure in die optisch-aktiven komponenten. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 169, 263.
- Treem, W. R., Stanley, C. A. et al. (1988) Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle, and fibroblasts. *N. Engl. J. Med.* 319, 1331-1336.
- Winter, S. C., Linn, L. S. et al. (1995) Plasma carnitine concentrations in pregnancy, cord blood, and neonates and children. *Clin. Chim. Acta*, 243, 87-93.
- Wolf, H., Stave, U. et al. (1974) Recent investigations on neonatal fat metabolism. *J. Perinat. Med.* 2, 75-87.