

SAĞLIKLI BİREYLERDE KOLORİMETRİK YÖNTEMLE SAPTANAN SERUM KARNİTİN DÜZEYLERİ

Ali Reza MASHEGANI, Banu ÖNVURAL, Gülgün OKTAY

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Karnitin (3-hidroksi-4-trimetil aminobütirat), yağlardan enerji üretiminde temel bir kofaktördür. Kasta kalıtsal karnitin eksikliği, insanlarda bazı kas hastalıklarına yol açmakta, sistemik eksikliği ise sıklıkla ölümlere neden olabilmektedir. Karnitin diğer hastalıklarla olan ilişkisi de, pek çok biyokimyacı ve klinisyen için merak odağı durumundadır. Karnitin, dokuda ve çeşitli vücut sıvılarında değişik yöntemlerle belirlenmiştir. Biz, karnitin eksikliğinin saptanması ve değişik hastalıklarla olan ilişkisinin araştırılabilmesi için, bir ön adım olarak, kolorimetrik yöntemle 41 sağlıklı erkek ve kadından oluşan grupta serum karnitin düzeylerini araştırdık ve laboratuvarımız için referans değerlerini saptadık.

Anahtar sözcükler: Karnitin, enzimatik-kolorimetrik yöntem

SUMMARY

Carnitine (3-hydroxy-4-trimethyl aminobutirate) is an essential cofactor for energy production from fatty acids. Hereditary carnitine deficiency in the muscle causes certain muscle diseases and when the deficiency is systemic, it often leads to death. Carnitine and its relation with other diseases is a focus of interest for many biochemists and clinicians. Carnitine has been determined in different tissues and body fluids by using radio isotopic, colorimetric and fluorometric methods. We measured serum carnitine concentrations in 41 healthy men and women and determined the reference levels of our laboratory.

Key words: Carnitine, enzymatic-colorimetic method

Karnitin (L-β-hidroksi-γ trimetilaminobütirik asid) ve açıl esterleri, hayvansal dokularda geniş dağılım gösterir ve özellikle, en fazla kaslarda bulunurlar. Karnitin, yağlardan enerji üretiminde temel bir kofaktördür. Kasta kalıtsal karnitin eksikliği, insanlarda bazı kas hastalıklarının yol açmakta ve sistemik eksikliği ise, sıklıkla ölümlere neden olmaktadır. Değerleri biyokimyasal açıdan olduğu kadar, klinik açıdan da, tanı ve bazı hastalıkların sağlığını izlenmesinde giderek artan bir şekilde ilgi çekmektedir. Bunlar Diabetes mellitusta (1), kardiyovasküler bozukluklarda (2,3,4, 5), kronik renal yetmezlik ve böbrek trans-

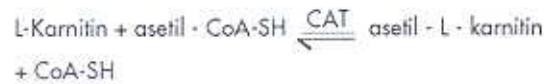
plantasyonlarında (6,7,8), hiperamonemik hastalıklarda (9), karaciğer sirozunda (10), septisemilerde (11), antikonvulzan tedavilerde (12,13) ve vb. birçok olguda araştırılmıştır. Düşük doku karnitin konsantrasyonları kasta lipid birikimine neden olarak kas güçsüzlüklerine yol açmakta ve bu semptomlar diyete L-Karnitin eklenmesi ile düzeltilebilmektedir(2,7,14).

Karnitin, çeşitli vücut sıvılarında ve dokularda radyoizotopik, enzimatik-kolorimetrik, fluorometrik ve kromatografik (HPLC) yöntemler ile belirlenmiştir (14 - 25).

(*) Bu çalışma 24-29 Ekim 1992 tarihinde Antalya'da yapılan XI. Ulusal Biyokimya Kongresinde sunulmuştur.

Karnitin ölçümünde kullanılan yöntemlerin çoğu, karnitin asetil transferaz kullanımı ile, asetil grubunun, asetil Koenzim A'dan karnitine transferine dayanır.

Biz de, karnitin eksikliğinin saptanması ve değişik hastalıklar ile olan ilişkisinin araştırılabilmesi amacı ile, bir ön adım olarak, Wieland ve arkadaşlarının (23) enzimatik-kolorimetrik yöntemini kullanarak, serum total ve serbest karnitin düzeylerinin laboratuvarımızdaki referans değerlerini saptadık. Kolorimetrik yöntemde prensip şöyledir: Serbest karnitin, asetil CoA ve karnitin asetil transferaz varlığında asetillenir ve CoA-SH oluşur. Daha sonra CoA-SH, DTNB ile reaksiyona girer ve karnitin miktarı ile orantılı olarak, sarırenkli 5-tiyo 2-nitrobenzoat anyonu meydana gelir. Kolorimetrik ölçüm 405nm.de yapılır.



Total karnitin için açıl karnitinler alkalen hidrolize serbestleştirilir. DTNB ile reaksiyona girebilecek diğer tiyot bileşikleri, ölçümden önce örnekler hidrojen peroksit ile işleme sokularak okside edilmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma grubumuzu, yaşları 18-35 olan 21 sağlıklı erkek ile, yaşları 20-35 olan 20 sağlıklı kadın oluşturdu.

Reaktifler:

1. DTNB/Hepes/EDTA Solüsyonu (DTNB, 2.7 mmol/L; Hepes, 0.5 mol/L; EDTA, 10 mmol/L; pH: 7.5).
2. Asetil-CoA Solüsyonu (12 mmol/L)
3. Karnitin asetiltransferaz feraz, (CAT, 400 kU/L) güvercin göğüs kasından
4. H₂O₂ Solüsyonu, %30
5. Katalaz (1.3 x 10⁶ kU/L) Boehringer Mannheim'dan, suda kristal süspansiyonu, 20 mg protein/ml, ca. 65 kU/mg 20 µl süspansiyon, 500 µl su ile dilüe edildi.
6. Perklorik asid I (1.2 mol/L)
7. Perklorik asid II (0.6 mol/L)
8. K₃PO₄ solüsyonu (0.7 mol/L)

Katalaz ve CAT seyreltileri her seferinde taze hazırlandı. 100 µl serum 100 µl perklorik asid I solüsyonu ile deproteinizasyon amacıyla karşılaştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 dk santrifüjlendi. Sediment iki kez 100 µl perklorik asid II ile yıkandı. İlk süpernatant ile bu yıkamalar birleştirildi ve 300 µl'lik bir kısmı 160 µl K₃PO₄ solüsyonu ile nötralize edildi. Nötraliz edilen örnek, santrifüj edilmeden önce 15-30 dk buzda tutuldu ve daha sonra, analiz için berrak süpernatant elde edildi (nötralize perklorik asid ekstratları).

Tiyol-oksidasyonu: Kullanımdan hemen önce 100 µl solüsyon "1" ve solüsyon "4"ün karışımı hazırlandı 150 µl nötralize perklorik asid ekstresi 50 µl su ile dilüe edildi. 20 µl "1+4" solüsyonundan eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra 10 µl solüsyonu "5" katıldı ve 30 dk (ara sıra hafif sallayarak) oda sıcaklığında bekletildi. Santrifüjden sonra, 200 µl süpernatant, karnitin tayini için kullanıldı.

Total karnitin tayini: Karnitin esterleri hidrolize edildi. Bu iş için, nötralize perklorik asid ekstratları KOH (1 mol/L) katıldıktan sonra 15 dk 56 C'de inkübe edildi. Örneği

nötralize etmek için eşit miktarda perklorik asid II kullanıldı. 15 dk buzlu suda bekletildikten sonra, $KClO_4$ presipitatu çöktürüldü. Berrak süpernatant analiz için kullanıldı.

KARNİTİN ÖLÇÜMÜ	
örnek (deproteinize, nötralize)	0.20 ml
Asetil-CoA SH solüsyonu (2)	0.01 ml
Plastik spatül ile karıştırıldı ve absorbanstaki değişim sabit (yaklaşık 5 dk) hale gelince, A_1 absorbansı kaydedildi.	
CAT Solüsyonu (3)	0.01 ml

Karıştırıldı ve 60 dk sonra A_2 kaydedildi.

Hesap: mmol/L cinsinden karnitin konsantrasyonu, Wieland ve arkadaşlarının formülüne göre (23) hesaplandı:

$$C = \Delta A \times 0.081 \text{ mmol/L}$$

(Sonuçlar dilüsyon faktörü (9.4) ile çarpıldı)

Tablo I. Serum Total ve Serbest Karnitin Ortalama Değerleri

GRUP	n	Serum Total Karnitin	Serum Serbest Karnitin
			$\mu\text{mol/L}$ ort. \pm SD
ERKEK	21	64.03 \pm 16.15	50.34 \pm 16.72
KADIN	20	48.60 \pm 13.51	37.56 \pm 13.83

$p < 0.02$

$p < 0.01$

TARTIŞMA

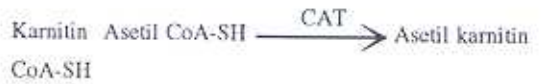
Sonuçlarımız literatürdeki birçok araştırıcının sonuçları ile uyum göstermektedir.

Radyoizotopik yöntemle ilk olarak çalışan Cederblad ve Linstadt(16) total karnitini $51 \pm 10 \mu\text{mol/L}$ bulmuşlardır.

Bohmer'in (25) modifiye radyoizotopik yöntemi ile serbest karnitin $43.1 \pm 8.9 \mu\text{mol/L}$ bulunmuştur.

Yine Mc Garry ve Foster (20) radyoizotopik tekniği, ekstraksiyon ve deproteinizasyon gerektirmeyen modifikasyon ile çalışmışlar; total ve serbest karnitin için $65.7 \pm 2.55 \mu\text{mol/L}$ ve $55.7 \pm 1.99 \mu\text{mol/L}$ değerlerini bulmuşlardır. Machana ve arkadaşları (19) fluorometrik yöntemle çalışmış ve 13 sağlıklı erişkinde serum serbest karnitini ortalama $43.9 \pm 8.4 \mu\text{mol/L}$ olarak saptamışlardır.

Kolorimetrik yöntem, karnitin belirlenmesinde kullanılan en eski yöntem olup, en yeni biçimi 1988'de Schafer ve arkadaşları (21) tarafından geliştirilmiştir.



Ayrıca, Cederblad ve arkadaşları spektrofotometrik yöntemi Cobas Bio-Santrifugal analizöre uyarlamışlardır (15). Burada serum total karnitini ortalama $58.0 \pm 3.6 \mu\text{mol/L}$ ve serbest karnitini $50.8 \pm 2.6 \mu\text{mol/L}$ bulmuşlardır.

Seccombe ve arkadaşları (26) da spektrofotometrik yöntemle çalışmışlar, ancak deproteinizasyon yerine, membran filtreleri

kullanmışlardır. Shihabi ve grubu (14) da deproteinizasyon gibi zaman alıcı ve zahmetli bir uygulamayı kullanmayı diyaliz ile işlemleri daha basite indirmişlerdir.

Yöntemini kullandığımız Wieland ve arkadaşlarının (23) bulguları ise şöyledir.

Serbest karnitin	(erkek)	49.3±8.7 µmol/L.
Serbest karnitin	(kadın)	36.9±8.2 µmol/L.
Açıl karnitin	(Erkek)	11.1±3.8 µmol/L.
Açıl karnitin	(kadın)	11.1±3.8 µmol/L.

Bu sonuçlar ile bizim sonuçlarımız çok yakınlık göstermektedir.

Biz Wieland et al. (23) yöntemini laboratuvarımız şartlarına uygunluk açısından tercih ettik. Bu alanda kullanılan radyoizotopik

yöntem, radyoaktif maddeler nedeniyle çalışana ve çevreye zararlıdır. Fluorometrik yöntem de, endojen fluoressan maddeler interferans yaptığı için dezavantajlıdır.

Enzimatik-kolorimetrik yöntemin zahmetli deproteinizasyon ve nötralizasyon evresi, daha az zaman alıcı bir işlemle değiştirilebilir. Seccomb ve arkadaşları (20) ile Shihabi ve arkadaşları (14) buna membran filtre ve diyaliz ile çözüm getirmişlerdir; bu hususta daha geniş araştırma olanakları bulunacaktır kantsındayız.

Serum düzeyleri geniş sınırlar arasında dağılım gösterdiğinden, tanı açısından serum düzeylerinin yanı sıra, doku düzeylerinin de çalışılmasının daha anlamlı sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Cederblad G, Hermansson G, Ludvigsson J. Plasma and urine carnitine in children with Diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1982; 125: 207-17.
2. Ferrari R, Ceconi C, Cargnoni A, et al. The effect of propionyl-L-carnitine on the ischemic and reperfused intact myocardium and on their derived mitochondria. *Cardiovas Drugs Ther* 1991; 5 (1): 57-65.
3. Regitz V. Metabolic alterations in end-stage and less severe heart failureP myocardial carnitine decrease. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28 (9): 611-7.
4. Rizzon P. High doses of L-carnitine in acute myocardial infarction. *Europ Heart J* 1989; 10 (6): 502-8.
5. Sassen LM, Bezstarosti K, Van der Giessen WJ, et al. L-propionyl-carnitine increases postischemic blood flow but does not affect recovery of energy charge. *Am J Physiol* 1991; 261: 172-80.
6. Kohse KP, Dech E, Rossle C, et al. The influence of kidney transplantation on carnitine metabolism. *Clin Neph.* 1988; 29 (4): 119-205.
7. Siami G, Clinton ME, Mrak R, et al. Evaluation of the effects of intravenous L-carnitine therapy of function, structure and fatty acid metabolism of skeletal muscle in patients receiving chronic hemodialysis. *Nefron* 1991; 57 (3): 306-13.
8. Wanner C, Schollmeyer P, Hörl W. Serum carnitine levels and carnitine esters of patients after kidney transplantation. *Metabolism* 1988; 37 (3): 263-7.
9. Othani Y. Secondary carnitine deficiency in hyperammonemic attacks of ornithine transcarbamoylase deficiency. *J Pediatr* 1988; 112 (3): 409-14.
10. Amodio P, Angeli P, Merkel C, Menon F, Gatta A. Plasma carnitine levels in liver cirrhosis. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28 (9): 619-26.

11. Davis AT. Increased acylcarnitine clearance and excretion in septic rats. *Biomed Biochim Acta* 1991; 50 (1): 81-6.
12. Carrina MF, Rozas I, Gomez M, Paz IM, Alonso C, Rodriguez Segade S. Short term effects of administration of anticonvulsant drugs on free carnitine in mouse serum and tissues. *Br J Pharmacol* 1991; 103 (2): 1179-83.
13. Carrina MF, Rozas I, Castro Gago M, et al. Alteration of renal carnitine metabolism by anticonvulsant treatment. *Neurology* 1991; 41 (9): 1444-52.
14. Shihabi ZK, Oles KS, McCormick CP, Penry JK. Serum and tissue carnitine assay based on dialysis. *Clin Chem* 1992; 38 (8): 1414-7.
15. Cederblad G, Harper P, Lindgren K. Spectrophotometry of carnitine in biological fluids and tissues with a Cobas Biocentrifugal Analyzer. *Clin Chem* 1986; 32 (2): 343-6.
16. Cederblad G, Linstadt S. A method for determination of carnitine in the picomole range. *Clin Chim Acta* 1972; 37: 235-43.
17. Cejka J, Kithier K. Serum carnitine quantification. *Clin Chem* 1992; 38 (2): 304-5.
18. Deufel T, Wieland OH. Sensitive assay of carnitine palmitoyl-transferase activity in tissue homogenates with a modified spectrophotometric method for enzymatic carnitine determination. *Clin Chim Acta* 1983; 135: 247-51.
19. Machara M, Kinoshita S, Watanabe K. A simple fluorometric method for determination of serum free carnitine. *Clin Chim Acta* 1988; 171: 311-6.
20. Mc Garry JD, Foster DW. An improved and simplified radioisotopic assay for the determination of free and esterified carnitine. *J Lipid Research* 1976; 17: 277-81.
21. Schafer J, Reichman H. A spectrophotometric method for L-carnitine determination. *Clin Chim Acta* 1989; 182: 187-94.
22. Tekeyame N. Measurement of free and esterified carnitine in tissue extracts by HPLC. *Anal Biochem* 1986; 158: 346-54.
23. Wieland OH, Deufel T, Paetzke BI. Method of enzymatic analysis. Weinheim FRG 1985; 8: 481-8.
24. Xia LJ, Folkers K. Improved methodology to assay carnitine and levels of free and total carnitine in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176 (3): 1617-23.
25. Böhmer T, Rydning A, Solberg HE. Carnitine Levels in human serum in health and disease. *Clin Chim Acta* 1974; 57: 55-61.
26. Secombe DW, Dodek P, Frohlich J, et al. Automated method for L-carnitine determination. *Clin Chem* 1976; 22 (10): 1589-92.