



NORTH-WEST UNIVERSITY
YUNIBESITI YA BOKONE-BOPHIRIMA
NOORDWES-UNIVERSITEIT

**INTREPRETASIE VAN β -OKSIDASIE METABOLIET
PROFIELE: 'N METABOLOMIKA GEBASEERDE
BENADERING**

CJF Taute

**INTREPRETASIE VAN β -OKSIDASIE METABOLIE
PROFIELE: 'N METABOLOMIKA GEBASEERDE
BENADERING**

CORNELIUS JOHANNES FRANS TAUTE, B.Sc., B.Sc. Honns.

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad Magister Scientiae in Biochemie aan die Potchefstroom kampus van die Noordwes Universiteit.

Studieleier: Prof. L.J. Mienie

Medestudieleier: Mnr. E. Erasmus

November 2005

Potchefstroom

INHOUDSOPGAWE

Lys van afkortings	vi
Lys van figure	ix
Lys van tabelle	xi
Bedankings	xiii
Summary	1
Opsomming	3
Hoofstuk 1	5
Inleiding	5
Hoofstuk 2: Literatuuroorsig	8
2.1 Inleiding	8
2.2 Die metaboolom en metabolomika in biochemie	9
2.3 Die metaboolom	11
2.3.1 Definisie van die metaboolom	11
2.3.2 Vereistes vir 'n molekool om deel van die metaboolom te wees	11
2.3.3 Eienskappe van die metaboolom en faktore wat die metaboolom beïnvloed	12
2.3.3.1 Algemene faktore wat die metaboolom beïnvloed	13
2.3.3.2 Ensieme en redes waarom metabolisme vanuit 'n ander oogpunt bestudeer behoort te word	14
2.4 Aangebore defekte van metabolisme en die metaboolom	17
2.5 Metabolomika	20
2.5.1 Definisie van metabolomika	21
2.5.2 Onderafdelings van metabolomika	22

2.5.2.1	Metaboliet Teikenanalises	23
2.5.2.2	Metaboliese Beeldskepping	23
2.5.2.3	Metabonomika	24
2.5.2.4	Globale Metaboliese Beeldskepping	25
2.5.3	Tekortkominge van metabolomika	25
2.6	Toegepaste metabolomika op mitochondriale vetsuur	
	β-oksidasie	27
2.6.1	Diagnose by plaaslike laboratorium	27
2.6.2	Vereistes vir 'n goeie metabolomika benadering	28
2.6.3	Toepaslikheid van GC-MS en LC-MSMS as analitiese tegnieke vir metabolomika	29
2.6.4	Redes vir die keuse mitochondriale vetsuur β-oksidasie	31
2.7	Mitochondriale β-oksidasie van vetsure, verwante defekte, inhibeerders en promotors	31
2.7.1	Aangebore defekte van vetsuur katabolisme	33
2.7.1.1	MCADD (Medium Ketting Asiel-KoA Dehidrogenase Defek)	34
2.7.1.2	LCADD (Lang Ketting Asiel-KoA Dehidrogenase Defek)	35
2.7.1.3	Glutaarsuururie Tipe II / MADD (Meervoudige Asiel-KoA Dehidrogenase Defek)	35
2.7.2	Tipes medikasie ingesluit by die studie	36
2.7.2.1	Valproaat	36
2.7.2.2	Statiene	37
2.7.2.3	L-karnitien	38
Hoofstuk 3:	Die metabolomika benaderingswyse	41
3.1	Die metabolomika benaderingswyse	42
3.2	Keuses van metaboliete wat ingesluit is	44
3.2.1	Organiese sure	44
3.2.1.1	Ketone	46

3.2.1.2 Krebs-siklus Intermediêre	47
3.2.1.3 Dikarboksielsure	48
3.2.1.4 Glisienkonjugate	50
3.2.2 Asielkarnitiene ingesluit vir die studie	51
3.3 Asielkarnitiënverhoudings	52
3.3.1. Glutaarsuururie Tipe II (Meervoudige Asiel-KoA Dehidrogenase Defek)	55
3.3.2 Lang Ketting Asiel-KoA Dehidrogenase Defek (LCADD)	56
3.3.3 Medium Ketting Asiel-KoA Dehidrogenase Defek (MCADD)	57
3.3.4 Statiene verhouding	59
Hoofstuk 4: Materiale en metodes	60
4.1. Urien monsters vir studie	60
4.2 Kreatinien bepaling	61
4.3 Organiese suur ekstraksie en voorbereiding	61
4.4 Asielkarnitiën voorbereiding en analise op die LC-MSMS	63
4.5 Statistiese verwerking	65
Hoofstuk 5: Resultate en bespreking van karnitiën beladings op proefpersone	67
5.1 Resultate en bespreking	67
5.1.1 Karnitiene en asielkarnitiene uitgeskei in uriene	67
5.1.2 Organiese sure uitgeskei in die uriene	70
5.1.2.1 Ketone en dikarboksielsure	70
5.1.2.2 Krebs-siklus intermediêre	73
5.1.2.3 Glisienkonjugate	74
5.2 Gevolgtrekking	76

Hoofstuk 6: Resultate en bespreking van homosigote en heterosigote van mitochondriale β-oksidase defekte	77
6.1 Kliniese beelde verkry van pasiënte	77
6.1.1 Glutaarsuururie Tipe II (Meervoudige Asiel-KoA Dehidrogenase Defek)	77
6.1.2 Medium Ketting Asiel-KoA Dehidrogenase Defek (MCADD)	78
6.2 Resultate en bespreking: Lineêre sommering vir heterosigote en homosigote van aangebore defekte van vetsuur katabolisme	78
6.2.1 Karnitiene en asielkarnitiene	79
6.2.2 Ketone en dikarboksielsure	82
6.2.3 Krebs Intermediêre	84
6.2.4 Glisienkonjugate	86
6.3 Samevattende bespreking: Lineêre sommering vir heterosigote en homosigote van aangebore defekte van vetsuur katabolisme	88
6.4 Resultate en bespreking: Asielkarnitien vergelykings vir heterosigote en homosigote wat ly aan aangebore defekte van vetsuur katabolisme	91
6.4.1 Statien metabolomika formule	92
6.4.2 LCADD metabolomika formule	95
6.4.3 MCADD metabolomika formule	97
6.4.4 GAI metabolomika formule	99
6.5 Samevattende bespreking: Asielkarnitien vergelykings vir heterosigote en homosigote wat ly aan aangebore defekte van vetsuur katabolisme	102
 Hoofstuk 7: Samevattende gevolgtrekking oor die studie	 103
 Hoofstuk 8: Voorstelle vir soortgelyk toekomstige studies	 105
 Literatuur verwysings	 108

Bylaag A	116
Bylaag B	117
Bylaag C	120
Bylaag D	128

LYS VAN AFKORTINGS

Σ	→	Die lineêre som van
[]	→	Konsentrasie van (mmol/mol kreatinien)
3OHButKar	→	3-OH Buturielkarnitien
ADP	→	Adenosien Difosfaat
Amu	→	Atomiese massa eenheid
ATP	→	Adenosien Trifosfaat
AsetielKar	→	Asetielkarnitien
ButurielKar	→	Buturielkarnitien
BSTFA	→	N,O-bis(trimetielsiliel)trifluoroasetamied
C°	→	Grade celsius
C°/min	→	Grade celsius per minuut
C6Kar	→	Heksanoïelkarnitien
C8Kar	→	Oktanoïelkarnitien
C10Kar	→	Dekanoïelkarnitien
C12Kar	→	Dodekanoïelkarnitien
CC12Kar	→	Onversadigde 12 koolstof langketting asielkarnitien
C14Kar	→	Tetradekanoïelkarnitien
CC14Kar	→	Onversadigde 14 koolstof langketting asielkarnitien
C16Kar	→	Heksadekanoïelkarnitien
CC16Kar	→	Onversadigde 16 koolstof langketting asielkarnitien
CPT1	→	Karnitien Palmitoiël Transferase 1
ddH ₂ O	→	Dubbel gedistilleerde water
DNA	→	Deoksieribonukleïensuur
eV	→	Elektronvolt
GAI	→	Glutaarsuururie Tipe 2
GC-MS	→	Gas Chromatografie Massa Spektrometrie
GlutakonielKar	→	Glutakonielkarnitien
GlutarielKar	→	Glutarielkarnitien

HCl	→	Waterstofchloried / Soutsuur
HDL	→	Hoë digtheid lipoproteïene
HMG-KoA	→	3-Hidroksie-3-Metiel-Glutariel Ko-ensiem A
KMR	→	Kernmagnetiese resonans
KoA	→	Ko-ensiem A
kV	→	Kilovolt
L/uur	→	Liter per uur
LC-MSMS	→	Vloeistof Chromatografie Tandem Massa Spektrometrie
LCADD	→	Langketting Asiel-KoA Dehidrogenase Defek
LDL	→	Lae digtheid lipoproteïene
MADD	→	Meervoudige Asiel-KoA Dehidrogenase Defek / Glutaarsuururie Tipe 2
mBar	→	Millibar
MCADD	→	Mediumketting Asiel-KoA Dehidrogenase Defek
mg%	→	Milligram persentasie
mg/g Kreatinien	→	Milligram per gram Kreatinien
min	→	Minuut
mL	→	Milliliter
mL/min	→	Milliliter per minuut
Mmol/mol Kreatinien	→	Millimol per mol Kreatinien
m/z	→	Massa per lading
N	→	Normaal
NAD	→	Nikotienamied Adenien Dinukleotied (Geoksideerde vorm)
NADH	→	Nikotienamied Adenien Dinukleotied (Gereduseerde vorm)
Na ₂ SO ₄	→	Natriumsulfaat
p	→	P-waarde
p _B	→	Bonferroni aangepaste p-waarde

pH	→	Logaritmiese uitdrukking van die waterstofioon konsentrasie
PropionielKar	→	Propionielkarnitien
Psi	→	Druk in pond per vierkante duim
RNA	→	Ribonukleïensuur
Rpm	→	Omwenteling per minuut
SOP	→	'Standard Operating Procedure'
TMCS	→	Trimetielchlorosilaan
TotAsiel	→	Totale lineêre som van asielkarnitiene
UV	→	Ultraviolet
V	→	Volt
μL	→	Mikroliter
μL/s	→	Mikroliter per sekonde

LYS VAN FIGURE

Figuur 1: Die metaboolom verwantskap. SMI staan vir 'Small Molecule Inventory'.	9
Figuur 2: Die verband tussen metaboliete, transkripte en gene.	18
Figuur 3: Mitochondriale β -oksidase van vetsure.	33
Figuur 4: Die chemiese struktuur van valproeësuur.	36
Figuur 5: 'n Paar voorbeelde van die struktuur van statiene.	38
Figuur 6: Die struktuur van die L-isomeer van karnitien.	39
Figuur 7: Die tradisionele beskouing van metabolisme teenoor die nuwe denkrigtings.	41
Figuur 8: Skematiese voorstelling van die ou diagnose van aangebore defekte van metabolisme en die voorgestelde nuwe benaderingswyse.	42
Figuur 9: Die struktuur van etielmaloonsuur.	46
Figuur 10: Die algemene struktuur van 2-metielsuksiensuur.	47
Figuur 11: Die Krebs-siklus.	48
Figuur 12: Die verskillende detoksifiserings paaie.	49
Figuur 13: Die transport van langketting vetsure d.m.v. L-karnitien na die mitochondriale matriks.	51
Figuur 14: Die invloed van L-karnitien belading en uitskeiding van karnitien metaboliete.	68
Figuur 15: Die invloed van L-karnitien belading op die verhouding van vry karnitien:totale asielkarnitien uitgeskei in die uriene.	69
Figuur 16: Ketone en dikarboksielsure uitgeskei in die uriene na L-karnitien belading.	71
Figuur 17: Krebs-siklus intermediêre uitgeskei in die uriene na L-karnitien belading.	73
Figuur 18: Glisienkonjugate uitgeskei in die uriene na L-karnitien belading.	75

Figuur 19: Karnitiene en asielkarnitiene van hetero en homosigotiese pasiënte wat ly aan aangebore defekte van β -oksidasie.	79
Figuur 20: Die verhouding van vry karnitien:totale asielkarnitien uitgeskei in die uriene vir heterosigotiese en homosigotiese pasiënte wat ly aan aangebore defekte van β -oksidasie.	80
Figuur 21: Ketone en dikarboksielsure uitgeskei in die uriene van hetero- en homosigoot pasiënte wat ly aan aangebore defekte van β -oksidasie.	82
Figuur 22: Krebs Intermediêre uitgeskei in die uriene van hetero- en homosigotiese pasiënte wat ly aan aangebore defekte van β -oksidasie.	85
Figuur 23: Glisienkonjugate uitgeskei in die uriene van hetero- en homosigotiese pasiënte wat ly aan aangebore defekte van β -oksidasie.	87
Figuur 24: Stasie metabolomika formule wat onderskei tussen verskillende aangebore defekte van vetsuur katabolisme.	93
Figuur 25: Stasie metabolomika formule vir normaal persone van verskillende ouderdomme en geslagte.	94
Figuur 26: LCADD metabolomika formule wat onderskei tussen verskillende aangebore defekte van vetsuur katabolisme.	95
Figuur 27: LCADD metabolomika formule vir normaal persone van verskillende ouderdomme en geslagte.	96
Figuur 28: MCADD metabolomika formule wat onderskei tussen verskillende aangebore defekte van vetsuur katabolisme.	98
Figuur 29: MCADD metabolomika formule vir normaal persone van verskillende ouderdomme en geslagte	99
Figuur 30: GAll metabolomika formule wat onderskei tussen verskillende aangebore defekte van vetsuur katabolisme.	100
Figuur 31: GAll metabolomika formule vir normaal persone van verskillende ouderdomme en geslagte.	101

LYS VAN TABELLE

Tabel 1: Groeperings van metaboliete vir metabolomika studie.	45
Tabel 2: Berekende p-waardes vir die gemiddeldes van die verskille in vrye karnitien konsentrasies vir verskillende karnitien beladings tye.	116
Tabel 3: Berekende p-waardes vir die gemiddeldes van die verskille in totale asielkarnitien konsentrasies vir verskillende karnitien beladings tye.	117
Tabel 4: Berekende p-waardes vir die gemiddeldes van die verskille in totale asielkarnitien:vry karnitien vir verskillende karnitien beladings tye.	118
Tabel 5: 95% Vertrouensintervalle vir metaboliet konsentrasie veranderinge tydens karnitien beladings.	119
Tabel 6: Numeriese waardes volgens die lineêre sommering benaderings vir metaboliet konsentrasie van homo- en heterosigoot pasiënte wat ly aan aangebore defekte van vetsuur katabolisme.	120
Tabel 7: Numeriese waardes volgens die asielkarnitien verhoudings vir homosigoot pasiënte wat ly aan aangebore defekte van metabolisme.	121
Tabel 8: Numeriese waardes volgens die statien asielkarnitien verhouding vir kontrole pasiënte asook normaal pasiënte van verskillende ouderdomme.	122
Tabel 9: Numeriese waardes volgens die LCADD (Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) asielkarnitien verhouding vir kontrole pasiënte asook normaal pasiënte van verskillende ouderdomme.	123
Tabel 10: Numeriese waardes volgens die MCADD (Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) asielkarnitien verhouding vir kontrole pasiënte asook normaal pasiënte van verskillende ouderdomme.	124

Tabel 11: Numeriese waardes volgens die GAI (Glutaarsuururie Tipe II) asiel-karnitien verhouding vir kontrole pasiënte asook normaal pasiënte van verskillende ouderdomme.	125
Tabel 12: Die praktiese effek bereken vir karnitien en asielkarnitiene.	126
Tabel 13: Die praktiese effek bereken vir organiese sure.	126
Tabel 14: Die praktiese effek vir die verskillende asielkarnitien formules wat ontwerp is. Die praktiese verskil toon die verskil van die verskillende ontwerpte formules t.o.v. mekaar aan.	127
Tabel 15: Die praktiese effek vir die asielkarnitien formules wat ontwerp is. Die praktiese verskil toon aan hoe die pasiënte met die betrokke defek verskil van normaal persone van verskillende ouderdomme en geslagte.	127

BEDANKINGS

Ek wil net graag die volgende persone bedank vir die hulp en bystand wat verskaf is, en nie net altyd in 'n akademiese kapasiteit nie.

Prof. L.J. Mienie, vir die vertroue in my om my 'n geleentheid tot 'n M.Sc studie te gee het asook hulp wat verskaf is al was hy ernstig siek.

Mnr. E. Erasmus, wat baie gehelp het met die met die skryf van die verhandeling asookl krisis bestuur.

Prof. Harry Kotze, wat altyd behulpsaam was as daar om hulp gevra is en my altyd moed in gepraat het.

Prof. F.H. van der Westhuizen, wat altyd 'n goeie woord te sê gehad het en ook my moed in gepraat het as omstandighede bleek gelyk het.

Prof P.J. Pretorius, wat altyd 'n tydjie gehad het om lekker te gesels oor interessantheite in enige tipe navorsing.

Dr. Henry Davis, vir die uienmonsters wat verskaf is vir die studie.

Die mede studente, wat altyd ondersteuning verskaf het en 'n lekker lag hier en daar.

SUMMARY

Metabolomics is an emerging field and requires a global approach to metabolism. It describes how varying factors (diet, exercise, disease, etc.) influences metabolism. A metabolomic approach can not only make it easier to detect changes in metabolic conversion but also shed new light on mechanisms in metabolism. Biomarkers for a given metabolic disease can easily be detected in the urine by conventional metabolic screening tests such as Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis of organic acids and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry analysis of acylcarnitines for homozygote patients. With this metabolomics based approach it might become easier to also detect heterozygote patients by grouping of the same biomarkers. In order to see if this is possible a metabolomics based approach was used in this study to see if heterozygotes with defects in mitochondrial β -oxidation can be diagnosed.

Two approaches were used. The effect of L-carnitine supplementation on β -oxidation in normal persons were studied to generate reference values. Heterozygote members of two families with different inborn errors in their fatty acid oxidation (Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect and Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Defect) were diagnosed by conventional urine tests.

A linear summation technique was designed and applied to the data obtained from the two families. The heterozygote members of both families had significantly elevated concentration values above reference values, but not so high as the homozygote members. Thus it can be concluded that heterozygote patients can be detected with urine tests with the use of the newly designed linear summation technique.

Basic- and advanced acylcarnitine ratios were calculated to enhance the differentiation between selected medications and diseases affecting β -oxidation with varying degrees of success. The acylcarnitine ratios that were calculated are only useful when it is already known that the disease is a defect of β -oxidation. It nonetheless gave an indication that this approach can be useful to diagnose heterozygote patients.

OPSOMMING

Metabolomika is 'n ontwikkelende veld waar daar van 'n globale benadering gebruik gemaak word om metabolisme te bestudeer. Dit beskryf hoe 'n verskeidenheid faktore (dieet, oefening, siekte, ens.) metabolisme beïnvloed. 'n Metabolomika gebaseerde benadering kan dit moontlik makliker maak om 'n verandering in metaboliese omset te bestudeer, insluitende die meganismes wat betrokke is by die verandering in metabolisme. Biomerkers vir 'n gegewe metaboliese defek kan maklik in die urine opgespoor word deur middel van konvensionele metaboliese siftingsanalises soos Gaschromatografie-Massa Spektrometrie analises van organiese sure en Vloeistofchromatografie-Tandem Massaspektrometrie analises vir asielkarnitiene by homosigotiese pasiënte. Met die nuwe metabolomika gebaseerde benadering is biomerkers saamgegroeper om moontlike heterosigotiese pasiënte op te spoor. Die metabolomika gebaseerde benadering is getoets deur te bepaal of heterosigote met defekte in mitochondriale β -oksidase gediagnoseer kon word.

Daar is van twee benaderings gebruik gemaak. Die eerste deel van die studie was om te bepaal wat die effek van L-karnitien suplementering op β -oksidase in normale persone was om sodoende verwysingswaardes te genereer. Heterosigotiese lede van twee families met verskillende aangebore defekte van vetsuuroksidasie (Mediumketting-asiel-KoA-dehidrogenase defek en Meervoudige Asiel-KoA-dehidrogenase defek) is gediagnoseer deur middel van konvensionele urientoetse.

'n Liniêre sommeringstegniek is ontwikkel en toegepas op die data wat vanaf die twee gesinne verkry is. Die heterosigotiese lede van beide gesinne se konsentrasiewaardes was aansienlik verhoog bo die normaalwaardes, maar nie so verhoog soos die homosigotiese gesinslede se konsentrasiewaardes nie. Dit

kan dus afgelei word dat heterosigote wel deur middel van urientoetse opgespoor kan word deur van die liniêre sommeringstegniek gebruik te maak.

Basiese- en gevorderde asielkarnitienverhoudings is bereken om die differensiasie tussen geselekteerde medikasie en siektes, wat β -oksidase affekteer, te verhoog. Die berekende asielkarnitienverhoudings is slegs bruikbaar as dit alreeds bekend is dat die betrokke siekte 'n β -oksidase defek is. Die metabolomika gebaseerde benadering dui wel aan dat dit 'n handige tegniek kan wees om heterosigote te diagnoseer.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Aangebore defekte van mitochondriale vetsuur β -oksidase is outosomaal resessief van aard en 'n kommerwekkende oorsaak van morbiditeit en dood by jong kinders en pasgebore babas (Bennett *et al.*, 2002). Daar word beraam dat 3-5% van alle onverwagte skielike dood by pasgebore babas en jong kinders 'n oorsprong het in 'n defek van vetsuur β -oksidase (Roe, 2002).

'n Defek op 'n koderende geen (of gene) vir ensieme van mitochondriale β -oksidase lei tot versteurde vetsuurkatabolisme. 'n Enkele defekte alleel (heterosigoties) presenteer gewoonlik geen simptome van 'n aangebore defek van metabolisme nie. Die ensiemaktiwiteit van die vetsuuroksidasie ensieme is genoegsaam om die metabolisme so normaal as moontlik te laat verloop. By die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte (Potchefstroomkampus van die Noordwes-Universiteit) is daar onlangs uriene ontvang van 'n bevestigde heterosigoot van Glutaarsuururie Tipe 2, wat eers in haar middeljare simptome getoon het en wat dui op Glutaarsuururie Tipe 2.

Heterosigote se biomerkers, wat uniek is vir 'n vetsuuroksidasiedefek, se konsentrasies kan geringe verskille toon ten opsigte van van normaalwaardes. Die geringe verskil word nie met konvensionele benaderings van organiese suur- (GC-MS) en asielkarnitien (LC-MSMS) siftingsanalises opgespoor nie. Duur, tydsame molekulêre metodes, op bloed- of biopsieweefsel, moet aangewend word vir bevestiging dat 'n heterosigoot 'n draer is van 'n aangebore defek van metabolisme.

As albei allele defek (homosigoties) is, presenteer simptome van 'n aangebore defek van metabolisme in die meeste gevalle. Ensiemaktiwiteit is nul of te laag

vir normale metabolisme en versteurings vind plaas. Alternatiewe metaboliese weë word geaktiveer en unieke metaboliëte word gevorm. Die unieke metaboliëte is afkomstig van sekondêre metaboliese weë wat help met detoksifisering, byvoorbeeld, die sitochroom p450 ensiemsisteem of die verskillende konjugasieweë (Liska, 1998).

Biomerkers van homosigote se konsentrasies wat ver bo normaal verhoog is, is maklik diagnoseerbaar met huidige siftingsanalises. GC-MS en LC-MSMS is twee tegnieke wat relatief vinnig, goedkoop, sensitief en selektief is. Molekulêre metodes word slegs as stawende bewyse vir 'n siftingsdiagnose gebruik, maar slegs indien die mutasie bekend is vir die betrokke populasiegroep.

Indien diagnose van 'n heterosigoot op 'n vinnig en relatief goedkoop wyse gedoen kan word, net soos vir homosigote, kan vroegtydige berading en behandeling verskaf word. 'n Heterosigoot presenteer nie hoë biemerker konsentrasies soos 'n homosigoot nie, maar ensiemaktiwiteit is verlaag ten opsigte van normaal. 'n Geringe mate van biemerker akkumulاسie kan dus voorkom.

Huidige intepretasie van siftingsanalises by die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte (Skool vir Biochemie, Potchefstroomkampus van die Noordwes-Universiteit) vind plaas deur die verhoudings van die substraat tot die produk in ag te neem vir 'n betrokke ensiem. As geen defek teenwoordig is nie, sal die verhouding stoichiometries ('n massa verhouding tussen reaktante en produkte) normaal voorkom. 'n Defek sal dus die verhouding versteur. 'n Metabolomikabepaling is voorgestel waar die somtotaal van die biemerkers (primêre en sekondêre metaboliëte) bereken word, asook verskillende asielkarnitiesverhoudings.

Die doel van die studie is om metabolomika toe te pas op aangebore mitochondriale β -oksidasie defekte om moontlike heterosigote te identifiseer op

metabolietvlak. 'n Sekondêre doel is om te bepaal wat die effek van karnitienbelading is op die metaboliete betrokke by mitochondriale β -oksidasie van 25 proefpersone deur van dieselfde metabolomika toepassing gebruik te maak.

Uriene van 25 proefpersone is verkry. Siftingsanalises is op die uriene gedoen soos vir verwysde kliniese gevalle. Onlangse pasiënte en hulle ouers (waar moontlik) se uriene is ook verkry.

Mitochondriale β -oksidasie is die teiken van die studie. Die eerste en belangrikste rede is reeds in die eerste paragraaf van die hoofstuk genoem: Die omvang en aard van die defek is ernstig. Verder is die metaboliese weg en sy metaboliete bekend en kan relatief onafhanklik van ander metaboliese weë uitgesonder word vir die studie.

Hoofstuk 2 is 'n literatuurstudie wat handel oor die metaboolom, metabolomika en algemene agtergrondteorie oor mitochondriale β -oksidasie en geassosieerde aangebore defekte van die metabolisme.

Hoofstuk 3 is 'n gedetailleerde uiteensetting van die metabolomika gebaseerde benaderings wat gebruik is vir die studie.

Hoofstuk 4 bevat die materiaal en metodes wat vir die projek gebruik is en Hoofstukke 5 en 6 is die weergee van resultate en die bespreking van die studie.

Hoofstuk 7 is 'n finale gevolgtrekking oor die resultate verkry uit die studie.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 Inleiding

Metabolisme is per definisie die somtotaal van alle chemiese prosesse wat plaasvind binne 'n organisme en elke chemiese proses word deur 'n ensiem gekataliseer.

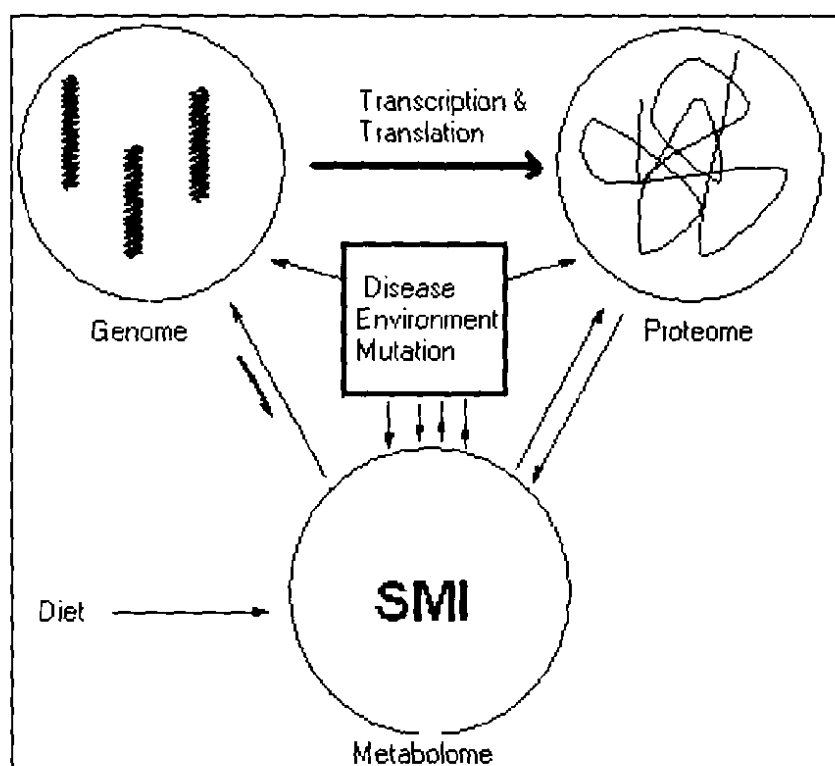
Metaboliese weë is tradisioneel beskou as 'n liniêre chemiese omskakelingsproses waar elke ensiem afsonderlik en individueel 'n spesifieke substraat kataliseer. Die hedendaagse siening in proteomika is dat ensieme 'n substraat of substrate nie individueel kataliseer nie, maar dat hulle substrate as ensiemnetwerke kataliseer. Ensiemnetwerke (net soos individuele ensieme) is afhanklik van die omringende fisiologiese en genotipiese omgewing wat 'n invloed uitoefen op die driedimensionele konformasie van die ensiemnetwerk (Cravatt *et al.*, 2004).

Tydens abnormale metabolisme, hetsy dit weens 'n aangebore defek of ander oorsake is, kan ensieme alternatiewe substrate kataliseer. Metaboliete kan dus saamgegroeper word vir substraattoekenning in die ensiemnetwerk. Die saamgroepering van metaboliete vir toekenning aan 'n gegewe ensiemnetwerk word *metabolomika* genoem. Hierdie tipe benadering het die potensiaal om 'n beter verklaring te gee vir die heterogene fenotipiese manifestasies van aangebore defekte van metabolisme.

'n Beter begrip van fenotipiese manifestasie en die verband daarvan met die genotipe, kan verbeterde kliniese diagnose van aangebore defekte van metabolisme tot gevolg hê. Gevolglik kan die diagnoses vroeër geskied en vroeëtydige terapeutiese intervensie kan plaasvind.

Defekte van mitochondriale vetsuur β -oksidase is 'n groep ernstige en potensieel dodelike defekte. Daar is 'n hoë heterogeniteit in simptome wat veroorsaak dat die diagnose en onderlinge onderskeid tussen die mitochondriale defekte nie altyd duidelik is nie. 'n Gepaste metabolomika benadering kan derhalwe bydra tot 'n alternatiewe benadering om milde vorme van aangebore mitochondriale defekte op te spoor.

2.2 Die metaboloom en metabolomika in biochemie



Figuur 1: Die metaboloom verwantskap. SMI staan vir 'Small Molecule Inventory (<http://www.esainc.com/Metabolomics/metabolomics.htm>).

Die doel van die genomprojek was om vas te stel hoeveel gene daar in die genoom is. Die aantal gene en hulle lokus op die genoom is vasgestel. Die oorgrote meerderheid van die gene se funksies is nog nie vasgestel nie. Die klem het nou verskuif na die opklaring van die proteïene waarvoor die gene

kodeer en wat die effek daarvan op die metabolisme en selseintransduksie is (Ghassemian *et al.*, 2005).

Die 'omika' (geheelbeeld / holistiese beeld) benaderingswyses (figuur 1) is ontwikkel om die biochemiese funksie van die genoom op te klaar. Transkriptoom (die geheelbeeld van DNA transkripte, dit wil sê RNA) het 'n 1:1 verhouding met die genoom, dit wil sê 'n geen kodeer vir 'n transkrip. Die proteoom (die geheelbeeld van alle proteïene wat natuurlik voor gekodeer word in 'n organisme), is meer kompleks vanweë faktore soos post translasionele modifikasie. Die proteïen se finale biochemiese rol is die bepalende faktor om vas te stel hoeveel proteïene verwant is aan een transkrip (byvoorbeeld, die globienfamilie).

Genomika en proteomika, die studie van die genoom en proteoom onderskeidelik (figuur 1), het dit tot dusver moontlik gemaak om die koppeling van geenuitdrukking tot translasielvlak te identifiseer. Dit het egter nie genoegsame inligting verskaf oor die biochemiese rol en onderlinge verband tussen die 'omikas' nie.

Met metabolomika word daar gepoog om 'n beter begrip te verkry oor die fenotipiese manifestasies, wat gepaardgaan met geenuitdrukking en hoe so 'n verandering op metaboliese vlak die genotipe kan beïnvloed (figuur 1). Die metaboloom is heterogeen in fisies-chemiese eienskappe sowel as struktuur. Dit bemoelijk 'n direkte koppeling met proteïen- en geenvlak. Die genoom beïnvloed die proteoom. Die metaboloom word deur beide die bogenoemde 'omikas' beïnvloed en het 'n negatiewe terugkoppelingseffek (figuur 1).

2.3 Die metabooloom

Net soos die genoom die somtotaal is van alle gene (koderend en nie-koderend), is die metabooloom die somtotaal van alle metaboliete wat deelneem aan fisiologiese prosesse. Die volgende paar paragrawe gee die definisie en toepaslike teorie oor die metabooloom.

2.3.1 Definisie van die metabooloom

Die metabooloom is die somtotaal van alle metaboliete wat in 'n organisme aangetref word. Dit is uniek vir 'n organisme in 'n spesifieke ontwikkelingsstadium onder 'n gegewe fisiologiese toestand. Die metabooloom is nie staties nie en verander soos die genoom, transkriptoom en proteoom verander en het 'n terugkoppeling wat deur endogene of eksogene faktore beïnvloed kan word (Berden *et al.*, 2000; Bennet *et al.*, 2002; Beecher, 2005).

Vanuit die definisie is dit duidelik dat die metabooloom 'n verteenwoordigende beeld van alle relatiewe lae molekulêre massa molekules is, wat betrokke is by die totale metabolisme van 'n organisme. Anders gestel, die metabooloom is die totale klein molekulêre komplement van 'n organisme, byvoorbeeld die '*Small Molecule Inventory*' (figuur 1).

2.3.2 Vereistes vir 'n molekule om deel van die metabooloom te wees

Die metabooloom is die totale versameling van relatiewe lae molekulêre massa molekules wat betrokke is by metabolisme. Daarom kan daar verwarring ontstaan oor die vereistes van 'n molekule om by die metabooloom ingesluit te word.

Eenvoudige organismes soos *S. cerevisiae* het ongeveer 600 metaboliete en meer as 6000 proteïene koderende gene (Berdan *et al.*, 2000). In die diereryk is daar ongeveer 40 000 unieke metaboliete geïdentifiseer (Barret, 2005) en ongeveer 100 000 metaboliete in die planteryk (Feihl *et al.*, 2004). Derhalwe moet daar vereistes wees waaraan 'n metaboliet moet voldoen, sodat dit as deel van 'n spesifieke organisme se metaboolom beskou kan word. Hierdie vereistes moet die volgende faktore in ag neem (Beecher, 2004):

- i. Ensieme, proteïene, peptiede, DNA en RNA is nie deel van die metaboolom nie. Hierdie makromolekules se afbraakprodukte ondergaan wel metabolisme en word daarom ingesluit in die metaboolom.
- ii. Strukturele en polimeriese makromolekules wat nie chemies aktief is nie, is ook nie deel van die metaboolom nie. Die betrokke afbraakprodukte word wel in die metaboolom ingesluit.
- iii. Xenobiotiese metaboliete word gewoonlik nie by die metaboolom ingesluit nie.
- iv. Nutriënte wat noodsaaklik is vir korrekte metaboliese- en fisiologiese werking vorm deel van die metaboolom.

2.3.3 Eienskappe van die metaboolom en faktore wat die metaboolom beïnvloed

DNA en RNA is saamgestel uit verskillende kombinasies van 4 basispare. Die basispare van DNA en RNA kan met identiese analitiese tegnieke geïdentifiseer en gekwantifiseer word. Daar is dus 'n redelike goeie behoud van fisies-chemiese- en strukturele verwantskap. Proteïene is saamgestel uit 20/21 aminosure. Elke aminosuur deel strukturele en fisies-chemiese soortgelyke funksionele groepe, naamlik die $-COOH$ groep en die $-NH_2$ groep. Aminosure is struktureel homolog en daar kan 'n univormige analitiese tegniek gebruik word om hulle te identifiseer en te kwantifiseer.

Metaboliete is baie heterogeen in struktuur, fisies-chemiese eienskappe en massa. Metaboliete moet heterogeen wees sodat fisiologiese prosesse korrek kan funksioneer. Elke metaboliet het sy eie unieke funksionele biochemiese rol. Daar is tans geen universele analitiese tegniek waarmee alle moontlike metaboliete met dieselfde metode geïdentifiseer en gekwantifiseer kan word nie. Die heterogeniteit van metaboliete is noodsaaklik vir die korrekte funksionering van alle fisiologiese prosesse, waar elke metaboliet sy eie funksionele biochemiese rol het.

Dit is dus baie duidelik dat die studie van die metaboolom baie meer kompleks en omvangryk is.

2.3.3.1 Algemene faktore wat die metaboolom beïnvloed

Die metaboolom verander voortdurend, soos wat die metabolisme voortdurend verander. Hierdie verandering staan as die metaboliese flux bekend. Die geringste verandering in die fisiologiese- of omgewingstoestand van 'n organisme (hetsy as gevolg van endogene of eksogene faktore (figuur 1)) sal daarom die metaboolom direk of indirek beïnvloed.

Geenregulering is 'n endogene faktor wat 'n merkbare rol speel in die verandering van die metaboolom. Enige verandering in geenstabiliteit (byvoorbeeld, mutasie) of geenekspresie (byvoorbeeld, oorekspresie, onderdrukking van ekspresie of foutiewe translase) sal weerspieël word op metaboliese vlak (figuur 1). Post-translasielike modifikasie is 'n verdere voorbeeld van 'n endogene faktor. Indien 'n splytingsensiem foutief is en post-translasielike modifikasie van 'n proteien verkeerdlik plaasvind, kan die proteien nie sy biochemiese rol vervul nie. Indien die proteien dan 'n kataboliese ensiem is, sal katabolisme nie korrek plaasvind nie.

'n Verandering in die fisiologiese toestand van 'n organisme het 'n meer geamplifiseerde effek op metabolietvlakke as op die transkripsionele- of translasielvlak (Berden *et al.*, 2000; Goodacre, 2004; Dunn *et al.*, 2004; Beecher, 2004; Heijnen *et al.*, 2005). Metaboliete is die stroomafprodukte van die koderende gene en kan daarom dien as biomerkers van 'n geen se funksionele status. Metaboliete kan ook optree as terugkoppelings- of stroomopbeheerders van gene-ekspressie (Heijnen *et al.*, 2005).

Eksogene faktore is alle faktore wat van buite die organisme se 'liggaam' is. Omgewingstoestande (UV-bestraling, besoedeling, ens.) en dieet is tipiese voorbeelde. Indien 'n persoon baie in die son is, sal meer melaniënpigment vorm om teen sonbrand te beskerm. Dit is 'n tipiese voorbeeld van metaboliese vloed in reaksie op 'n eksogene faktor.

'n Ander eksogene faktor is 'n persoon wat 'n kataboliese ensiemdefek het, waar simptome slegs manifesteer as 'n gegewe voedingstof ingeneem word, wat nie deur die betrokke kataboliese ensiem gekataliseer kan word nie. Dus is dieet ook 'n eksogene faktor wat 'n rol kan speel op die metaboolom (figuur 1).

2.3.3.2 Ensieme en redes waarom metabolisme vanuit 'n ander oogpunt bestudeer behoort te word

Metabolisme is tradisioneel beskou as 'n liniêre proses (Figuur 2, links) waar 'n ensiem 'n substraat kataliseer om 'n produk te word wat op sy beurt weer as substraat optree vir 'n ander ensiem. In die verlede is eksperimente *in vitro* gedoen om te bepaal vir watter substraat is 'n betrokke ensiem spesifiek (Cravatt *et al.* 2005a; Cravatt *et al.*, 2005b). Ongelukkig word daar fundamentele biochemiese en fisiologiese beginsels buite rekening gelaat met hierdie eksperimentele benadering.

Post-translasionele modifikasie van proteïene geskied nie noodwendig direk na translase nie en die post-translasionele modifikasie kan afhanklik wees van verskeie fisiologiese faktore waaraan die ensiem moet voldoen voor dit kan plaasvind. Die biochemiese funksie van die ensiem is die bepalende faktor van watter tipe post-translasionele modifikasie gaan plaavind. Post-translasionele modifikasie kan nie volledig *in vitro* plaasvind nie en dus kan ensiemaktiwiteit en substraatvoorkeur beïnvloed word.

In die immunoglobien-familie kan gesien word dat die hoofstruktuur soortgelyk is vir al die proteïene voor post-translasionele modifikasie. Die verskil kom slegs in tydens die post-translasionele modifikasie. Elke individuele immunoglobien het 'n spesifieke immunologiese funksie. As dit egter nodig sou wees, kan die verskillende immunoglobiene se funksies oorvleuel om gapings wat ontstaan in biochemiese funksionaliteit, te vul. Dieselfde geld vir ensieme, dit wil sê, indien een ensiem nie sy biochemiese funksie kan vervul nie, sal ander ensieme kompenseer om metabolisme so normaal moontlik te laat verloop.

Dit is 'n feit dat ensieme *in vitro* anders funksioneer as *in vivo*. *In vitro* is ensiem geïsoleerde stelsels waar daar geen interaksie met ander metaboliese weë is nie. Ook word slegs gekyk na watter substrate chemiese omskakeling ondergaan. Ensieme kompeteer *in vivo* vir substrate en kan mekaar stimuleer of inhibeer. Hulle funksioneer dus nie as individuele katalitiese entiteite nie; eerder as katalitiese netwerke (Cravatt *et al.*, 2004; Fridman *et al.*, 2005; Barret, 2005; Cravatt *et al.*, 2005a; Cravatt *et al.*, 2005b).

Ensiemnetwerke (figuur 2, regs) is ondersteunend of koderend ten opsigte van die onderlinge ensieme wat betrokke is by 'n netwerk. Elke ensiem het 'n eie unieke pH, temperatuur en veranderlike fisiologiese toestand waarby dit optimaal sal funksioneer. Verskeie ensieme kompeteer vir substrate en op enige gegewe oomblik kan een betrokke substraat 'n heterogene versameling produkte lewer, as gevolg van die onderlinge ensiemnetwerke (Cravatt *et al.*, 2005a; Cravatt *et*

al., 2005b). Proteomika het eksperimenteel bewys dat ensieme wat betrokke by 'n gemeenskaplike metaboliese weg is, waar die ensieme in 'liniêre' opeenvolging die onderlinge substrate en produkte kataliseer; 'n positiewe ko-ekspressie op transkripsionele en translasionele vlak kan ondergaan (Cravatt *et al.*, 2005a; Cravatt *et al.*, 2005b; Church *et al.*, 2005).

Die koderende geen of gene van 'n ensiem wat stroomop is in 'n metaboliese weg, se ekspressie bevorder die ekspressie van gene wat kodeer vir ensieme stroomaf in daardie metaboliese weg (Church *et al.*, 2005). Dit kan moontlik verklaar waarom sekere defekte, waar die ensiem vroeg in die metaboliese weg voorkom, 'n algehele inhibisie van die metaboliese weg tot gevolg het. Al is daar genoegsame substraat beskikbaar vanaf alternatiewe metaboliese weë vir die latere ensieme in die betrokke metaboliese weg, funksioneer hierdie ensieme nie.

Biochemici en molekulêre bioloë het op die huidige stadium nie genoegsame kennis van sellulêre biologie om voldoende verduideliking te verskaf vir 'n metaboliese weg en sy toegekende ensieme en verwante substrate nie. 'n Ensiem het 'n groter affiniteit vir een spesifieke tipe substraat en 'n laer affiniteit in vir 'n ander tipe substraat, maar 'n verandering in die fisiologiese milieu van 'n ensiem kan die ensiem se affiniteit vir 'n tipe substraat verander (Berden *et al.*, 2000; Cravatt *et al.*, 2004; Hoefsloot *et al.*, 2005).

Op 'n soortgelyke wyse kan die verandering in die fisiologiese milieu van 'n metaboliet die molekule se fisies-chemiese eienskappe verander. Indien die omgewing (waarin die metaboliet voorkom) se pH daal, kan die metaboliet se struktuur verander (bv. 'n =O wat 'n -OH word). Die ensiem het dan waarskynlik 'n baie laer of hoër affiniteit vir die veranderde substraat wat die metaboliese vloed sal verander en derhalwe ook die metabooloom.

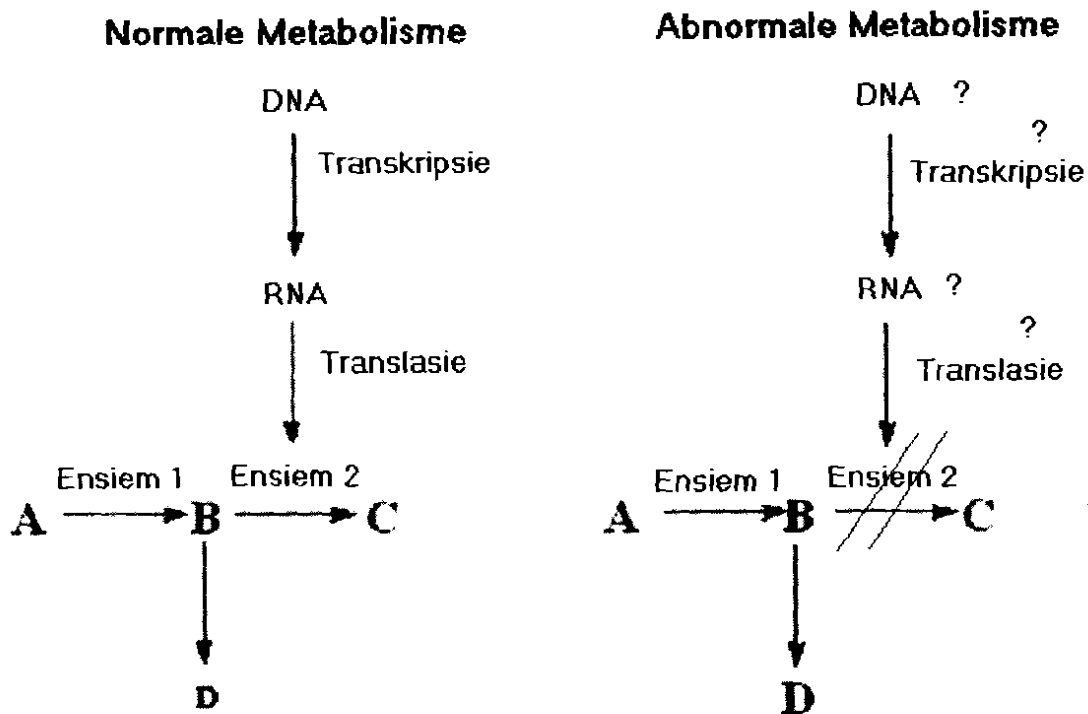
Linieriteit van 'n betrokke metaboliese weg moet dus eerder gesien word as 'n weg van voorkeur vir 'n substraat waar die betrokke ensieme 'n hoë affiniteit het vir die opeenvolgende substrate en produkte. 'n Metaboliese weg word dus slegs 'n weg van voorkeur vir ensiemreaksies vir struktureel verwante metaboliete onder ideale fisiologiese toestande (Rajasimha, 2004).

Na aanleiding van die vorige paragrawe is dit duidelik dat die tradisionele benadering van metabolisme moet verander, aangesien ensieme as 'n biochemiese eenheid funksioneer. Verder behoort in gedagte gehou te word dat metabolisme 'n allesomvattende fisiologiese proses is en dat 'n klein veranderinkie in een deel van die metaboolom weerspieël sal word in alle dele van die metaboolom.

2.4 Aangebore defekte van metabolisme en die metaboolom

Die oorsaak van aangebore defekte van metabolisme is tradisioneel beskou as 'n puntmutasie in die koderende geen of gene vir 'n ensiem. Verder is dit moontlik dat aangebore defekte ook die gevolg kan wees van puntmutasies of geen delesies in koderende gene vir transkripsie faktore of RNA-polimerase, foutiewe translasie of selfs die onvermoë van 'n ensiem om aan sy betrokke ko-faktor te bind (figuur 2, regs).

Homosigote het 'n defek op albei allele van die geen of gene wat kodeer vir 'n ensiem. Die ensiem het in die meeste gevalle 'n verlaagde aktiwiteit. Die onvermoë van die ensiem om sy betrokke substraat te kataboliseer, lei tot die opeenhoping van die substraat sodat sekondêre of alternatiewe metaboliese weë geaktiveer moet word om die gevaar van toksisiteit te vermy.



Figuur 2: Die verband tussen metaboliete, transkripte en gene (A, B en C is normale primêre metaboliete; D is alternatiewe sekondêre metaboliete wat kan vorm; ? stel 'n onbekende fout voor).

Ensiemnetwerke wat by detoksifisering betrokke is, word in die meerderheid van gevalle van aangebore defekte oorweldig, sodat fenotipiese manifestasie van die defekte ensiem plaasvind. Die verandering in die metabolisme is as gevolg van die akkumulاسie van metaboliete en hierdie akkumuleerde metaboliete word as biomerkers gebruik. Die biomerkers is uniek en is 'n goeie aanduiding van waar in die metaboliese weg die defek is.

Metaboliese sifting word verkieslik op uriene gedoen, omdat dit 'n nie-indringende metode is om biologiese materiaal te versamel. Dit is ook maklik bekombaar en die biomerkers vir die oorgrote meerderheid van aangebore defekte, word in meetbare hoeveelhede in uriene aangetref en vergemaklik diagnose.

Hierdie benadering was tot dusver suksesvol vir die identifikasie en diagnose van homosigote. Heterosigote aan die ander kant, kan nie met die tradisionele benadering geïdentifiseer of gediagnoseer word nie. Daar is gewoonlik genoegsame ensiemaktiwiteit om die metabolisme so na aan normaal te laat plaasvind. Die gevolg is dat die metabolietprofiel normaal voorkom en wat die diagnose van die heterosigote feitlik onmoontlik maak. Verder het die pasiënte geen tot baie milde simptome van aangebore defekte van metabolisme. Om hierdie probleem te oorkom, moet duur, tydsame molekulêre metodes gebruik word om positief te kan vasstel of 'n pasiënt 'n heterosigoot is of nie.

Hierdie probleem kan moontlik oorkom word deur die identifikasie en diagnostiese benadering te verskuif van individuele biomerkers na 'n geheelbeeld van metaboliete, dit wil sê, om 'n metaboloomprofiel saam te stel wat uniek vir 'n gegewe aangebore defek is. Dit verhoog die potensiaal vir meer sensitiewe en meer selektiewe diagnose van defekte.

Heterosigote in 'n spesifieke defek vertoon 'n afname in die ensiemaktiwiteit wat by daardie defek voorkom. Daar kan dus 'n mate van metabolietakkumulاسie wees, maar nie genoegsaam om simptome te presenteer nie. Die geringe mate van akkumulاسie behoort sigbaar te wees in die metaboloom omdat die metabolisme nie heeltemal normaal verloop nie.

'n Outosomaal resessief aangebore defek van metabolisme, waarvoor daar al geruime tyd siftingsanalises gedoen word, vir beide heterosigotiese en homosigotiese pasiënte, is sistiese fibrose (Inal *et al.*, 2000; Grody *et al.*, 2004). Die siftingsanalise spoor slegs homosigotiese pasiënte op. Heterosigotiese pasiënte kan slegs met behulp van molekulêre tegnieke opgespoor word. Indien heterosigotiese pasiënte opgespoor kon word, kan genetiese konsultasie verskaf word (Grody *et al.*, 2004). Vroegtydige behandeling kan dus plaasvind en sodoende lewenskwaliteit verbeter (Inal *et al.*, 2000; Grody *et al.*, 2004).

Soos afgelei vanuit die vorige paragraaf, sal dit 'n groot impak hê indien heterosigotiese pasiënte van aangebore defekte van vetsuurkatabolisme deur middel van siftingsanalises opgespoor kan word. Indien dit moontlik sou wees om heterosigote op te spoor met siftingsanalises, kan daar vroegtydige terapeutiese intervensie plaasvind.

Ouers wat heterosigote is, kan vroegtydig voorkomende- en behandelingstrategieë beplan en toepas as hulle 'n homosigotiese kind kry. Kinders wat met 'n aangebore defek gebore word, word telkemale eers gediagnoseer nadat die siekte die eerste keer presenteer. In sommige gevalle sterf daardie kind. Die moontlikheid bestaan dat meerdere kinders wat in dieselfde gesin gebore word, ook kan sterf aan dieselfde defek, wat erg is vir so 'n gesin. Die emosionele impak kan dus ook beperk word deur vroegtydige heterosigootdiagnose. Vroegtydige heterosigootdeteksie kan potensieel lewens red en algehele lewenskwaliteit verbeter.

In die geval van homosigote wat aan verskillende aangebore defekte van metabolisme ly (maar homogene simptome toon), kan die metaboolom dit moontlik maak om hulle beter van mekaar te onderskei. Behandeling kan meer spesifiek saamgestel word. Meer spesifieke behandeling kan die lewenskwaliteit verbeter aangesien beter herstel, die kanse op oorlewing verhoog.

2.5 Metabolomika

Metabolomika is die mees komplekse afdeling van die nuwe 'omika' benaderings in biochemie, want dit behels die metaboolom. Die metaboolom is baie kompleks en heterogeen en dit maak die studie daarvan baie kompleks. Verskeie onderafdelings van metabolomika benader die probleme wat die metaboolom vanuit verskillende perspektiewe skep. In die volgende paar

paragrafe word die aandag gevestig op metabolomika en sy onderafdelings sowel as relevante teorie wat betrokke is.

Metabolomika het baie potensiaal, veral vir kliniese diagnostiek (L J Mienie, 2005, *persoonlike gesprek*):

- i. Gewasse kan vroeër opgespoor word deur middel van verfynde analises. Homovanilien is 'n biomerker vir neuroblastoom. Roetine laboratoriumanalises kan homovanilien as metaboliet opgespoor, lank voor die gewas met konvensionele mediese metodes opgespoor word. 'n Geheelbeeld van die metaboolom sal dus moontlike gewasmetaboliete vroegtydig opspoor. Berading en behandeling kan vroegtydig verskaf word.
- ii. Nuwe metaboliese weë of nuwe variasies op reeds bekende metaboliese weë kan ontdek word. Verder kan metaboliete ontdek word en identifiseer word wat diagnosties betekenisvol kan wees.
- iii. Milde vorme van reeds bekende aangebore defekte kan ontdek word en derhalwe gediagnoseer word.
- iv. Dit kan moontlik wees om defekte in anabolisme te identifiseer. Anaboliese defekte word moeilik gediagnoseer, want in teenstelling met katabolisme, is daar geen produkte wat in die urine of bloed voorkom nie. Foutiewe anaboliese ensieme kataliseer nie die reaksie nie en die molekules van die anaboliese weg akkumuleer nie.

2.5.1 Definisie van metabolomika

Metabolomika sluit alle tegnieke en benaderingswyses in wat gebruik kan word om die metaboolom wat geld vir 'n spesifieke fisiologiese toestand of ontwikkelingsfase van 'n organisme op te spoor. 'n Dinamiese, verstaanbare beeld van die metaboolom moet weergegee kan word. Geen metaboliet, wat eie aan die organisme is, mag weggelaat word nie. Om dit te bereik, moet tegnieke se selektiwiteit en sensitiwiteit so hoog moontlik wees dat dit voldoen aan die

vermelde vereistes (Fiehn *et al.*, 2002; Alvarez-Vasquez *et al.*, 2004; Beecher, 2004; Davis *et al.*, 2004).

Dit is duidelik dat daar vereistes is om metabolomika korrek toe te pas (Fiehn *et al.*, 2002; Alvarez-Vasquez *et al.*, 2004; Beecher, 2004; Davis *et al.*, 2004). Huidige tegnologie kan nie daaraan voldoen nie, omdat hedendaagse analitiese metodes slegs 'n statiese beeld van die metaboloom kan verskaf en evalueer. Met 'n statiese beeld word bedoel dat slegs 'n oombliklike beeld verkry word van die metabolisme. Geen verdere verandering vind in die metabolisme plaas nie, bv. in 'n urienmonster sal daar geen ensieme wees wat metaboliete kataliseer nie. Die enigste invloed kan deur bakteriële kontaminasie dan plaasvind.

In statiese toestande word alle metaboliese prosesse, eie aan die organisme wat in die studie gebruik word, gestop en sodoende word metaboliese flux ook gestop. Die toepaslike analitiese tegniek word dan *in vitro* of *in silico* gebruik,; met ander woorde, die bepaling word op 'n spesifieke tyd in die metaboliese vloed gemaak. Dinamiese toestande is aan die ander kant die kontinue evaluering van die metaboloom *in vivo* en hoe die metaboliese vloed verander, soos fisiologiese toestande verander.

As daar gewerk word met dinamiese- en statiese toestande, moet in gedagte gehou word dat die metaboloom korrek weergegee moet word en dat die tegniek of benaderingswyse nie die metaboliese vloed op enige manier mag beïnvloed nie.

2.5.2 Onderafdelings van metabolomika

Metabolomika is die versamelnaam vir 'n groep verwante benaderingswyses en tegnieke wat gebruik word om die metaboloom te beskryf. Elke tegniek het sy

eie voordele en nadele, asook spesifieke toepassings. In die volgende paragrawe sal die hoofonderafdelings van metabolomika bespreek word.

2.5.2.1 Metaboliet Teikenanalises

In hierdie geval word 'n vooraf gedefinieerde individuele metaboliet of metaboliete, wat betrokke is by 'n spesifieke metaboliese reaksie, ondersoek. Die benaderingswyse is kwalitatief en kwantitatief. Uitgebreide monstervoorbereiding en metabolietskeiding vind plaas. Lae bepalingsgrense vir die betrokke metaboliete is nodig om bruikbare data te genereer (Fiehn *et al.*, 2002; Beecher, 2004; Barret, 2005). Chromatografiese skeiding, gevolg deur 'n sensitiewe bepaling deur middel van massaspektrometrie of UV metodes, word gebruik vir metabolietanalises. Toepassings van die benaderingswyse sal tipies wees om substraatspesifisiteit van 'n betrokke ensiem of ensiemnetwerk te bepaal (Barret, 2005).

2.5.2.2 Metaboliese beeldskepping

Hierdie benaderingswyse behels die identifikasie en kwantifikasie van 'n aantal vooraf gedefinieerde metaboliete wat by 'n spesifieke metaboliese weg betrokke is. Monster voorbereiding behels die isolering en ekstraksie van die metaboliete sodat iooninterferensie tydens deteksie verminder (Fiehn *et al.*, 2002; Barret, 2005).

Skeiding van metaboliete is deur middel van gaschromatografie gedoen en deteksie vind plaas deur middel van massaspektrometrie. Sensitiwiteit moet dus baie hoog wees vir die korrekte skeiding en kwantifisering van die metaboliete (Beecher, 2004).

Die effekte van medikasie op 'n spesifieke metaboliese weg of selfs die effekte van 'n siektetoestand daarop kan met behulp van dié tipe benadering ondersoek word. Die funksionele opklaring van metaboliete en die metaboliete se verbintenis tot 'n metaboliese weg, kan so opgeklaar word en staan bekend as die sogenaamde funksionele metaboliese sifting (Dunn *et al.*, 2005).

2.5.2.3 Metabonomika

Metabonomika is 'n term wat algemeen verwar word met metabolomika. Metabolomika is die onbevooroordeelde studie van die somtotaal van alle metaboliete in 'n betrokke metaboliese weg. Metabonomika verskil in dié opsig dat dit die onbevooroordeelde evaluering van endogene metaboliete in 'n spesifieke weefsel of biologiese vloeistof behels. Metabonomika is dus 'n onderafdeling van metabolomika (Beecher, 2004; Goodacre, 2004).

Die tegnieke wat gebruik word, wissel van chromatografiese- tot elektroforetiese metodes om metaboliete te skei en verskeie metodes van deteksie (massaspektrometrie, UV, ens.). 'n Algehele beeld op 'n spesifieke tyd word verkry (Goodacre, 2004).

Die benadering ondersoek hoe metaboliese flux verander vir spesifieke kondisies of vir veranderinge in die organisme - byvoorbeeld hoe die statiese metaboliese profiele van 'n pasiënt voor en na 'n behandeling lyk. In dié geval sal 'n statiese metaboliese beeld verkry word, deur die neem van 'n bloed- of urienmonster op die betrokke tydstip.

2.5.2.4. Globale Metaboliese Beeldskepping

Dit is 'n vinnige, hoë deursettingsbenadering waarmee 'n globale beeld van 'n monster verkry word van 'n biologiese monster vir algehele klassifikasie. Geen identifisering of kwantifisering van metaboliete plaas nie. Slegs 'n kwalitatiewe patroon van die biologiese status op 'n gegewe tyd word verkry en dit word vergelyk met soortgelyke patrone wat op ander tye waar die biologiese status verskil verkry (Beecher, 2004; Goodacre, 2004).

KMR (Kern Magnetiese Resonans) tegnologie word gebruik en monster voorbereiding is eenvoudig en vinnig. Geen chromatografiese skeiding is nodig nie. Resultate word vinnig gegenereer. Die tegniek is egter nie so sensitief of selektief nie. Die patroon wat verkry word, word gewoonlik voorgestel op 'n 3D-grafiese stelsel. Hoogs gespesialiseerde rekenaarstelsels is nodig om die onderskeie patrone te vergelyk (Kell, 2004; Charlton *et al.*, 2005).

Hierdie metode kan uitgesproke veranderings in metabolietkonsentrasies opspoor. Dus is kliniese diagnose van siektes met robuuste metaboliese afwykings 'n goeie toepassing hiervan.

2.5.3 Tekortkominge van metabolomika

Metabolomika is nie sonder tekortkominge nie, maar goeie kompensasie word deur die benaderings gegee.

Metabolomika-verwante tegnieke genereer groot hoeveelhede data en dit is problematies om die data sinvol, akkuraat en korrek te analiseer. Tans is daar verskeie universiteite en maatskappye regoor die wêreld wat besig om rekenaar gebaseerde stelsels te ontwikkel om die probleem op te los.

'n Verdere probleem is die feit dat daar nie 'n direkte liniêre korrelasie is tussen die metaboloom en sy voorloper 'omikas' nie. Oor die algemeen het 'n organisme ook meer proteïene koderende gene as metaboliete. Hierdie twee probleme word op verskeie maniere opgelos. Elke groep wat 'n metabolomikastudie doen, het 'n eie unieke benaderingswyse om die twee probleme aan te spreek.

Die analise van biologiese weefsels of vloeistowwe sal slegs 'n totale metabolietbeeld gee, wat uniek is vir daardie tipe biologiese monster. Die metaboloom van hartweefsel verskil byvoorbeeld drasties van dié wat in urine verkry word. Gevolglik is dit nie moontlik om 'n geheelbeeld te verkry van die totale metaboloom van die organisme nie.

'n Voorbeeld wat die laaste twee paragrawe goed demonstreer, is 'n pasiënt met 'n aangebore defek van metabolisme wat 'n a-simptomatiese episode het en geen verhoogde teikenmetaboliete tydens die uriënversameling toon nie. In hierdie geval sou 'n lever- of spierbiopsie waarskynlik 'n duideliker diagnose kon lever van die betrokke aangebore defek (Mienie 2005, *persoonlike gesprek*).

Huidige studies in metabolomika gee slegs 'n statiese, *in vitro* beeld van die metaboloom. Dit is ook in die meeste gevalle slegs 'n klein deeltjie van die totale metaboloom. Mens moet in gedagte hou dat die metaboloom van oomblik tot oomblik verander en dat dit afhanklik is van endogene en eksogene faktore.

Per definisie is huidige studies dus nie werklike metabolomika nie, omdat dit nie voldoen aan al die vereistes wat vir metabolomika gestel word nie. Huidige benaderingswyses is dus 'n stap na 'n ware metabolomika. Ware metabolomika sal 'n kontinue, dinamiese beeld van die metaboloom *in vivo* weerspieël en die metaboliese flux akkuraat weergee. Indien dit moontlik kan wees om 'n detektor te ontwikkel wat *in vivo* kontinue metings kan doen, soos om die metabolisme te verander, sal dit die eerste ware metabolomika wees per streng definisie.

2.6 Toegepaste metabolomika op mitochondriale vetsuur β -oksidasie

Hierdie studie poog om 'n toegepaste metabolomika benadering te gebruik om 'n heterosigoot van 'n aangebore defek van metabolisme op te spoor. Verder poog dit om die effek van karnitienbelading op proefpersone se mitochondriale vetsuur β -oksidasie te ondersoek. Laastens is die moontlike onderskeid van die verskillende defekte op metabolietvlak 'n verdere doel.

2.6.1 Diagnose by plaaslike laboratorium

Uriene- en bloedmonsters van pasiënte met moontlike aangebore defekte van metabolisme word deur medici na die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte (Skool vir Biochemie, Potchefstroomkampus, Noordwes-Universiteit) gestuur. Die uriene word dan volgens toepaslike, gestandaardiseerde prosedures (Standard Operating Procedures) voorberei en respektiewelik met die GC-MS en LC-MSMS gespuit om organiese sure en asielkarnitiene te analiseer. Interne standaarde word gebruik vir kwalitatiewe en semi-kwantitatiewe bepaling van metaboliete in uriene.

Absolute kwantifisering word nie gedoen nie, aangesien dit tydsaam is en omdat 'n semi-kwantitatiewe metode voldoende is vir diagnose. Semi-kwantitatief beteken dat die interne standaard wat gebruik word, van die begin van die analise by die monster ingesluit word, sodat dit dieselfde proses as die metaboliete in die monster ondergaan.

Die interne standaard ondergaan dan teoreties dieselfde persentasie ekstraksie vanuit die oorspronklike monster as wat die onderskeie metaboliete ondergaan het. Foute wat tydens monstervoorbereiding plaasgevind het, bly dus konstant. Die metaboliete word verder relatief tot die interne standaard as persentasievoorkoms uitgedruk. Indien merker metaboliete vir 'n spesifieke

aangebore defek van metabolisme verhoog is bo normaalwaardes, is die diagnose positief.

2.6.2 Vereistes vir 'n goeie metabolomika benadering

Enige benadering moet aan sekere vereistes voldoen en verskeie faktore moet in ag geneem word. Vir metabolomikagerigte navorsing moet daar verseker word dat (Fiehn, 2002):

- i. Genoegsame biologiese weefsel of biologiese vloeistof beskikbaar is indien dit nodig is om analises te herhaal.
- ii. Manipulasie van die verkrygte materiaal (homogenisering, ekstraksie of stoor van die weefsel) moet sodanig gedoen word dat geen belangrike metaboliete verlore gaan nie.
- iii. Monstervoorbereiding (derivatisering) vir analises op die betrokke apparaat moet so gedoen word dat 'n verstaanbare beeld verskaf word van al die belangrike metaboliete in die monster.

Daar moet in gedagte gehou word dat die metabolomikabenadering slegs suksesvol sal wees as die benaderingswyse verstaanbaar, selektief en sensitief is.

Die volgende moet ingedagte gehou word met die keuse van 'n metaboliese reaksie, metaboliese weg of sel/weefsel-metabolisme om 'n sinvolle metabolomika benaderingswyse te ontwerp (Fiehn, 2002; Hoefsloot *et al.*, 2004):

- i. Kies 'n metaboliese netwerk waar 'n statiese beeld 'n verstaanbare weergawe van die werklike gebeure weerspieël en waarvan die stoichiometrie goed bekend is. Die metaboliese reaksies moet gestop kan

word sodra weefsel of vloeistof versamel is, sodat 'n korrekte metaboliese beeld gegee kan word. Kennis van die stoichiometrie van 'n metaboliese weg kan diagnose vergemaklik.

- ii. Dit moet in gedagte gehou word dat elke proteien koderende (sowel as nie-koderende) geen meer as een biochemiese funksie kan hê en dat gene nie 'n baie hoë homologie het met kodering vir ensieme nie.
- iii. Metaboliese weë wat eksperimenteel ontdek word, moet vergelykbaar wees met gemeenskaplike metaboliëte van reeds bekende metaboliese weë.

Die wyse waarop mitochondriale β -oksidasie in die studie benader word, is 'n oorvleueling van metaboliese beeldskepping en metabonomika. Daar word gekyk na die metaboliëte betrokke by die metabolisme en hoe aangebore defekte van metabolisme die urenkonsentrasies van die metaboliëte beïnvloed.

2.6.3 Toepaslikheid van GC-MS en LC-MSMS as analitiese tegnieke vir metabolomika

'n Biologiese monster moet op so 'n wyse gesuiwer word, dat dit die deteksie van metaboliëte van belang nog steeds toelaat, terwyl enige ongewenste onsuiverhede verwyder moet word, sodat dit moontlike isomeeronderskeid vergemaklik.

Indien geen chromatografiese skeiding sou plaasvind nie, veral by baie kru biologiese monsters, kan daar verskeie probleme opduik. Die detektor kan beskadig word en iononderdrukking kan plaasvind.

Tot dusver is daar in verskeie metabolomikabenaderings gebruik gemaak van een of ander vorm van chromatografiese skeiding, gevolg deur deteksie. Die deteksie is in die oorgrote meerderheid van gevalle massaspektrometrie. GC-

MS en LC-MSMS is baie goeie keuses vir die studie van metabolomika, maar daar moet onthou word dat slegs 'n statiese metaboliese geheelbeeld verkry kan word.

Elkeen van die bogenoemde tegnieke het wel hulle eie voor- en nadele.

Die GC-MS het die voordeel van relatief vinnige metabolietidentifikasie met baie goeie resolusie, maar is minder sensitief ten opsigte van nie-vlugtige, hoë molekulêre metaboliete. Verder vereis dit ekstensiewe monstervoorbereiding. Die GC-MS het goeie sensitiwiteit en selektiwiteit waar konsentrasies van so laag as 10^{-12} M kan opgespoor word (Clarke *et al.*, 2003; Mienie 2005, *persoonlike gesprek*).

Die LC-MSMS werk by laer temperature as die GC-MS en vlugtigheid van 'n biologiese monster is nie 'n voorvereiste vir deteksie nie. Monstervoorbereiding is relatief vinnig maar metabolietidentifikasie is meer tydsaam. Verswakte ionisasie vind plaas by sekere metaboliete, bv. isoprenoïde en ko-faktore en verlaagde sensitiwiteit vir globale metabolietanalises is die gevolg. 'n Groter massadeteksiespektrum kan geanaliseer word en laer metabolietkonsentrasies van so laag as 10^{-15} M (Clarke *et al.*, 2003; Fiehn *et al.*, 2004; Erasmus 2005, *persoonlike gesprek*) kan gemeet word.

Beide die GC-MS en LC-MSMS is geskik vir metabolomiese toepassings, maar as gevolg van die verskille in hoe metaboliete geanaliseer word deur die twee tegnieke en die onderlinge variasie in enige gegewe datastel, kan die datastelle nie direk met mekaar vergelyk word nie. Die datastelle kan wel komplementêr ten opsigte van mekaar gebruik word.

2.6.4 Redes vir die keuse van mitochondriale vetsuur β -oksidasie

Die ensieme wat by mitochondriale vetsuur β -oksidasie betrokke is, is reeds geïdentifiseer en goed gekarakteriseer. Die betrokke ensiemdefekte is ook goed bestudeer en kan effektief behandel word.

Die metaboliete wat betrokke is by mitochondriale vetsuur β -oksidasie is almal geïdentifiseer en toegeken aan spesifieke ensieme en gevolglik ook die verwante ensiemdefekte. Die betrokke metaboliese defekte het 'n hoë heterogeniteit in presentering, maar kan goed onderskei word van ander aangebore defekte van metabolisme, ten spyte van die feit dat die defekte, wat verwant is aan mitochondriale β -oksidasie, nie altyd so goed van mekaar onderskei kan word nie.

2.7 Mitochondriale β -oksidasie van vetsure, verwante defekte, inhibeerders en promotors

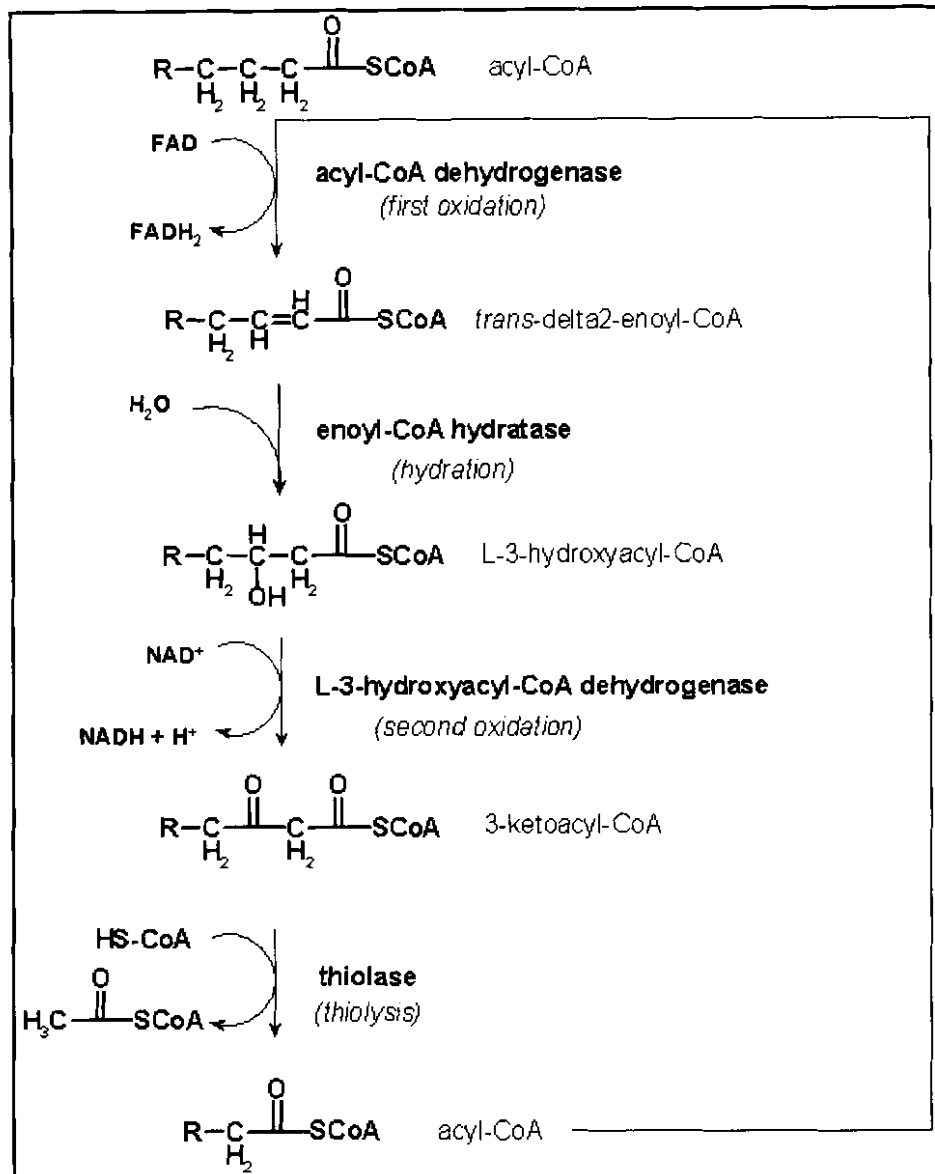
In die afgelope 30 jaar is daar ongeveer 22 verskillende defekte van mitochondriale β -oksidasie geïdentifiseer (Matern *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2002). Die defekte is heterogeen in fenotipiese manifestasie en wissel van hepatiese ensefalopatie, kardiomiopatie, perifêre neuropatie, skielike dood en swangerskap gekompliseerd deur lewervervetting (Blaskovics *et al.*, 2005; Matern *et al.*, 2005). Die betrokke defekte se voorkoms wissel van 1:8000 tot 1:100 000 geboortes en is verantwoordelik vir 5-8% van alle SIDS (Sudden Infant Death Syndrome) voorvalle (Matern *et al.*, 2005).

Defekte van mitochondriale β -oksidasie kan wees as gevolg van 'n vroeë terminasie van 'n stopkodon; splytingsetelverandering; klein kodon delesies of inplasings in die ooplesraamwerk of sogenaamde *mis-sense* volgorde variasies (Bross *et al.*, 2004).

Die metaboliese rol van mitochondriale β -oksidasie is die katabolisme van vetsure (\leq C16) om asetiel-KoA aan die Krebs-siklus te lewer, sodat gereduseerde elektrondraers of ketogenese vir die produksie van 3-OH-bottersuur gevorm kan word. 'n Defek in die betrokke katabolisme sal akute verstourings veroorsaak in die globale energiemetabolisme (Matern *et al.*, 2005). Die aangebore defekte van metabolisme van mitochondriale β -oksidasie moet dringend aandag geniet. Huidige analises van die defekte kan gewoonlik slegs homosigote identifiseer en net tydens fenotipiese manifestasie (simptomatiese episodes) van die defekte. Ongelukkig word uriene meestal verkry van homosigotiese pasiënte tydens a-simptomatiese episodes.

Tydens 'n a-simptomatiese episode, verkeer die vetsuurkatabolisme nie onder enige metaboliese druk nie en alternatiewe metabolismes kan kompenseer. Dus word 'normale' metabolietkonsentrasies waargeneem en 'n diagnose kan gemis word, wat lewens kan kos (Blaskovics *et al.*, 2005).

Behandeling vir die defekte is oor die algemeen koolhidraatsupplementering om energievlakke konstant te hou en hipoglisemie te vermy. Karntiensupplementering word ook verskaf om asielkarnitienkonjugering te bevorder. Natriumbikarbonaat word verder as behandeling gebruik in die gevalle waar asidose voorkom. Korrekte dieet is die mees suksesvolle vorm van behandeling in die meeste gevalle van die betrokke defekte (Blaskovics *et al.*, 2005).



Figuur 3: Mitochondriale β -oksidatie van vetsure
http://www.med.unibs.it/~marchesi/beta_ox.gif

2.7.1 Aangebore defekte van vetzuurkatabolisme

In die volgende paar paragrawe sal geselekteerde defekte van vetzuurkatabolisme kortliks bespreek word. Slegs defekte wat by die studie ingesluit is, gaan bespreek word, nl. MCADD (Mediumketting-asiel-KoA-

dehidrogenase Defek), LCADD (Langketting-asiel-KoA-dehidrogenase defek) en Glutaarsuururie Tipe II.

Net in die geval van MCADD en Glutaarsuururie Tipe II, was uriene van heterosigote en homosigote vanuit dieselfde gesin vir elke defek beskikbaar gewees. In die geval van LCADD kon slegs uriene van 'n homosigotiese pasiënt verkry word.

2.7.1.1 MCADD (Mediumketting-asiel-KoA-dehidrogenase defek)

Internasionaal is die voorkoms van MCADD 1 in 12000 geboortes; 1 in 10000 geboortes in Europa en 1 in 9000 geboortes in die VSA (OMIM – MCAD, 2005). MCADD is die mees algemene vetsuurkatabolismedefek onder die kaukasiese bevolking. Dit kan presenteer van geboorte tot middeljare (Bros *et al.*, 2004; OMIM – MCAD, 2005). Vetsure van C6 tot C10 kettinglengte word gekataboliseer.

Mense met MCADD kan met tye α -simptomaties wees en het dan weer episodes van hipoketotiese hipoglisemie, letargie, braking en hepatiese koma (OMIM – MCAD, 2005). In die ergste gevalle kan pasiënte sterf. Laboratoriumtoetse kan moontlike verhoogde dikarboksielsure van mediumketting lengte en mediumketting asielkarnitiene aandui en heksanoëlgliisien is 'n baie goeie merker metaboliet (Blaskovics *et al.*, 2005; OMIM – MCAD, 2005). Verder kan metaboliete, wat met ω -oksidase, ω -1-oksidase en peroksisomale oksidasie geassosieer word, voorkom. 'n Baie akkurate diagnose moet gemaak word, want die metaboliete kom ook by diabetiese ketoasidose (Blaskovics *et al.*, 2005; OMIM – MCAD, 2005) voor.

2.7.1.2 LCADD (Langketting-asiel-KoA-dehidrogenase defek)

Die voorkoms van LCADD is grootliks onbekend. In Finland is dit 1 in 240 geboortes (OMIM – LCAD, 2005). LCADD se kliniese beeld stem baie ooreen met dié van MCADD, maar veral hart- en skeletspiere word aangetas. Die kettinglengte strek van C12 tot C16. Daar is twee bekende vorme: die neonatale vorm tas die hartspier aan en die volwasse vorm tas die skeletspiere aan (OMIM – LCAD, 2005). Pasiënte is met tye a-simptomaties en het dan weer episodes van hipoketotiese hipoglisemie, braking, hepatomegalie en kardiomegalie (Blaskovics *et al.*, 2005; OMIM – LCAD, 2005).

Laboratoriumtoetse toon gewoonlik die teenwoordigheid van langketting dikarboksielsure en langkettingasielkarnitiene aan. Karnitien- en koolhidraatsupplementering is die mees algemene behandeling vir die defek, maar kan 'n vals metaboliese beeld verskaf tydens diagnose (Blaskovics *et al.*, 2005; OMIM – LCAD, 2005).

2.7.1.3 Glutaarsuururie Tipe II / MADD (Meervoudige Asiel-KoA-dehidrogenase defek)

Verskeie asiel-KoA dehidrogenase ensieme word beïnvloed en gevolglik verskeie metaboliese weë. Pasiënte presenteer binne 24 tot 48 uur na geboorte met simptome van hipotonie, hepatomegalie, hipoglisemie en metaboliese asidose (Grice *et al.*, 2000; Andresen, 2003). Die ensiem wat in die meerdere van gevalle defek is, is ETF (Electron Transfer Flavoproteien) dehidrogenase (OMIM, 2005). Weens die aard van die defek (dat verskeie vorme van die asiel-KoA-dehidrogenases defek kan wees), is die spesifieke voorkoms onbekend.

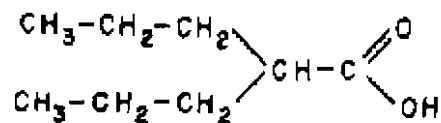
Diagnose dui op verskeie metaboliete en sluit verskeie kettinglengtes van dikarboksielsure en asielkarnitiene en ook Krebs siklus intermediêre in (Grice *et*

al., 2000; Andresen, 2003; Blaskovics *et al.*, 2005). Hoewel daar twee vorme van Glutaarsuururie is (tipe I en II), word die onderskeid op grond van biomerkers gedoen. Glutaarsuururie Tipe I het 3-OH-glutaarsuur as biemerker en Glutaarsuururie Tipe II het 2-OH-glutaarsuur as biemerker (Grice *et al.*, 2000; Andresen, 2003). 'n Lae vet- en lae proteiendieet word aanbeveel met riboflavin supplementering (Grice *et al.*, 2000; Andresen, 2003; Blaskovics *et al.*, 2005).

2.7.2 Tipes medikasie ingesluit by die studie

Per definisie van die metaboloom sal medikasie geklassifiseer word as xenobiotika. Valproaat en statiene is ingesluit by die studie, maar slegs by die bepaling van die asielkarnitiënverhoudings. Beide die medikasies het 'n steurende invloed op vetsuorkatabolisme (Mienie 2005, *persoonlike gesprek*).

2.7.2.1 Valproaat



Figuur 4 : Die chemiese struktuur van valproeësuur
(<http://>

Valproaat (2-n-propiel-pentanoësuur) is 'n vertakte ketting vetsuur wat gebruik word in die terapeutiese behandeling van epilepsie, maar kan met langdurige gebruik hepatotoksies wees (Duran *et al.*, 2001).

Behandeling met valproaat het verskeie effekte op β -oksidase en nouverwante metabolismes. Ketonmetabolisme word beïnvloed en daar ontstaan ook 'n wanbalans in die KoASH:asiel-KoA verhouding. Verdere effekte is die induksie

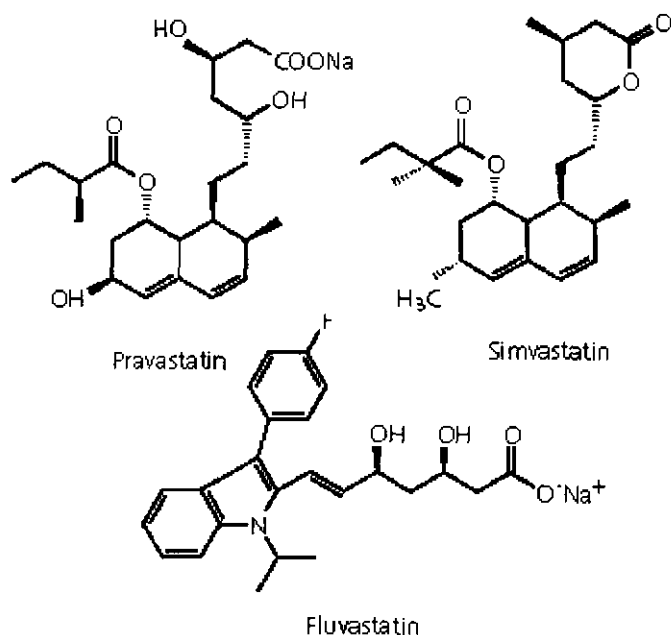
van ω -oksidasie, asook verhoogde karnities en glisienkonjugasie (Duran *et al.*, 2001).

Dit is duidelik dat valproaat 'n rol gaan speel as daar 'n metabolomika gebaseerde benadering gebruik word om aangebore defekte in vetsuuroksidasie te bestudeer. Om dié rede is valproaat in berekening gebring tydens die asielkarnitiesverhoudings in Hoofstuk 5.

2.7.2.2 Statiene

Statiene is medikasie wat alledaags gerbuik word om LDL cholesterol te verlaag deur die inhibisie van 3-hidroksie-3-metiel-glutariel-KoA reduktase. Die inhibisie het tot gevolg dat 3-hidroksie-3-metiel-glutariel-KoA ophoop en gekataboliseer word na asetiel-KoA. Die totale asetiel-KoA metabolisme sal verskuif om sodoende te kompenseer en dus sal vetsuuroksidasie beïnvloed word, asook die Krebs siklus.

Verdere gevolge van die inhibisie van 3-hidroksie-3-metiel-glutariel-KoA reduktase is dat geen cholesterol en isoprenoïdsintese kan plaasvind nie. Die ko-ensiem Q10 sintese word gevolglik ook daardeur geraak (Blizkanov, 2002).

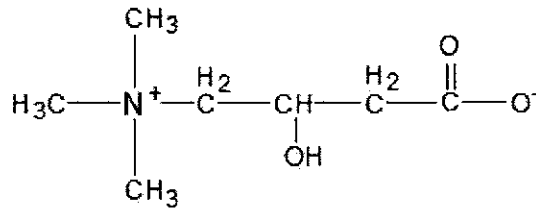


Figuur 5 : 'n Paar voorbeelde van die struktuur van statiene

(

2.7.2.3 L-karnitien

L-karnitien staan ook bekend as β -OH- γ -N-trimetiel-amino-bottersuur. Sintese vind primêr in die niere plaas, waar die aminosure lisien en metionien 'n kondensaat vorm, naamlik γ -buturobetaine. Sekondêre sintese vind in die lewer plaas, waar die γ -buturobetaine gehidroksileer word om L-karnitien te sintetiseer. L-karnitiensintese aktiwiteit is ouderdomsverwant, waar aktiwiteit hoër is in adolessente en volwassenes as in jong kinders en pasgeborenes (Cairns *et al.*, 2000). L-karnitien en die verwante karnitienkonjugate is liggaamseie verbindings en word dus ingesluit by die studie as belangrike metaboliete.



Figuur 6 : Die struktuur van die L isomeer van karnitien
 (http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/lca_0060.shtml)

Maksimale konsentrasies in die bloed word bereik na 3.5 uur met 'n halfleeftyd van 15 ure. Vrye karnitien wat oraal toegedien word, se biobeskikbaarheid wissel tussen 54% en 81%; derhalwe kan nie alle vrye karnitien wat oraal ingeneem word, geabsorbeer word nie (Kelly, 1998; Rebouche, 1998). 'n Orale dosis van 2g versadig die intestinale slymvlies (Kelly, 1998). Dit moet ook genoem word dat die biobeskikbaarheid van L-karnitien in die vorm van suplementering wissel tussen 14% tot 18% van die dosis wat gegee is, en geskied deur 'n passiewe absorpsiemeganisme (Rebouche, 2004).

'n Karnitienpoel kom voor in die weefsels van soogdiere waar daar onveresterde L-karnitien (ook genoem vrye karnitien) asook 'n wye verskeidenheid asielkarnitiene voorkom (Rebouche, 1998; Rebouche, 2004).

Die funksie van L-karnitien is die transport van langkettingvetsure oor die mitochondriale binnemembraan na die mitochondriale matriks toe vir β -oksidasie. L-Karnitien suplementering is die algemene behandeling wat gegee word by defekte van vetsuurkatabolisme. Fase 2 detoksifisering (konjugering) word aangehelp deur meer vrye karnitien (Mienie, 2005, *persoonlike gesprek*).

Karnitien suplementering het die vermoë om simptome te verlig van defekte van vetsuurkatabolisme, maar tot dusver is geen beslissende resultate verkry wat

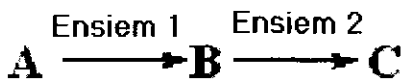
kan bewys dat L-karnitien 'n positiewe- of nuleffek op vetsuuroksidasie of laktaatproduksie het nie(Kelly, 1998; Cairns *et al.*, 2000).

HOOFSTUK 3

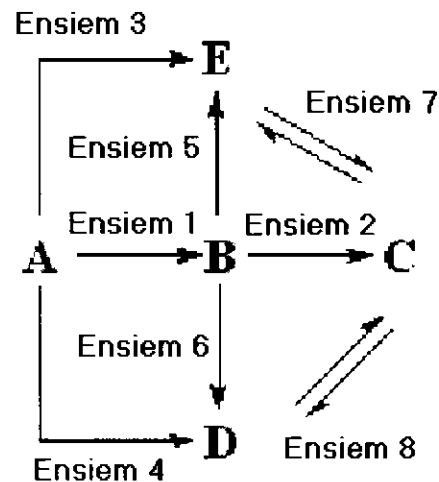
DIE METABOLOMIKA BENADERINGSWYSE

In die volgende paragrawe word die benaderingswyse vir die studie bespreek. Die metaboliete wat in die studie ingesluit is, sal bespreek word. Verder sal daar bespreking wees oor die nuut ontwerpe asielkarnitiënverhoudings.

Metabolisme: Tradisionele Beskouing



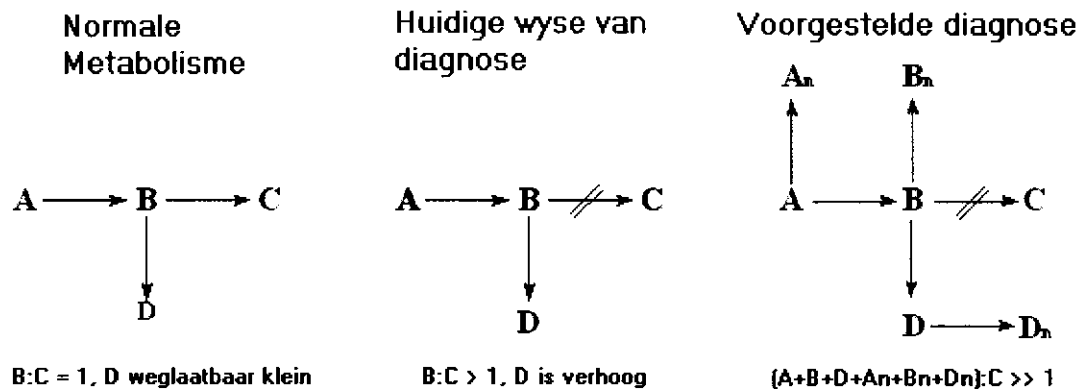
Metabolisme: Die Nuwe Benadering



Figuur 7: Die tradisionele beskouing van metabolisme teenoor die nuwe denkrigtings.
(A, B, C, D en E is willekeurige toekennings vir metaboliete)

Soos alreeds bespreek in Hoofstuk 2, is metabolisme in die geheel meer as net die liniêre opeenvolging van biochemiese reaksies wat deur ensieme gekataliseer word. Deur na die geheelbeeld van metaboliete te gaan kyk, in plaas van na individuele metaboliete, kan daar moontlik 'n beter begrip van metabolisme verkry word. Die benadering wat in hierdie, asook die volgende paragrawe, voorgestel word, is slegs 'n moontlike benaderingswyse en moet nie as absoluut beskou word nie. Dit moet eerder beskou word as een van die vele nuwe modelle wat voorgestel word.

3.1 Die metabolomika benaderingswyse



Figuur 8: Skematiese voorstelling van die huidige diagnose van aangebore defekte van metabolisme en die voorgestelde nuwe benaderingswyse (A, B, C, D, A_n, B_n en D_n is willekeurige voorstellings van metaboliete. Die reaksiepyle stel ensieme voor)

Indien 'n teoretiese stoichiometrie van 1:1 tydens normale metabolisme voorkom tussen substraat en produk vir 'n gegewe ensiem, sal A:B en B:C dus beide in 'n 1:1 verhouding ten opsigte van mekaar wees. Die alternatiewe metaboliete wat kan vorm, D, kom in weglaatbare konsentrasies voor (Figuur 8, linker skema).

'n Ensiemdefek (figuur 8, middel skema) sal C se konsentrasie laat daal. B sal akkumuleer en net so sal A akkumuleer. Detoksifisering sal alternatiewe metaboliete, D, se konsentrasies laat toeneem in diagnosties betekenisvolle hoeveelhede. Die verhouding van B:C sal versteur word; dus is B:C > 1 wat potensieel gebruik kan word om die defek te diagnoseer. Die akkumulering van A en D dien verder as biomerkers vir die gegewe ensiemdefek. Tradisioneel is die diagnose gebaseer op die individuele metaboliete om 'n ensiemdefek te identifiseer.

Vir die doeleindes van die studie, word daar aangeneem dat willekeurige metaboliete A, B, C en D se waarde nooit gelyk sal wees aan nul nie en ook nie negatief mag wees nie. Die aanname word gemaak op die beginsel, soos in

Hoofstuk 2 genoem, dat ensieme en/of ensiemnetwerke sal kompenseer indien daar 'n versteuring in die normale metabolisme is.

Die alternatiewe metaboliete A_n , B_n en D_n mag enige willekeurige positiewe waarde hê en mag ook gelyk wees aan nul. Die alternatiewe metaboliete is die gevolg van ensieme en/of ensiemnetwerke wat kompenseer vir versteurde metabolisme. In dié geval mag die waardes nul wees omdat individue se metabolisme van mekaar verskil. Dit is moontlik dat aktiwiteit van individue se detoksifiseringsmeganismes verskil.

Die nuwe benadering stel voor dat die geheelbeeld van metaboliete wat akkumuleer in ag geneem moet word, dit wil sê, dit moet alle biomerkers en geakkumuleerde metaboliete wat met 'n gegewe ensiemdefek geassosieer word, insluit.

Figuur 8 van regter skema: Sodra metaboliet B akkumuleer, sal metaboliet A ook akkumuleer. Die akkumulasies sal oorfloei na ander metaboliese weë en sekondêre metaboliete, A_n en B_n respektiewelik, word gevorm. Alternatiewe metaboliete D, en sekondêre metaboliete D_n , se konsentrasie sal verhoog na diagnosties betekenisvolle vlakke.

Basiese algebra stel dat 'n verhouding tussen twee getalle die verband is tussen die twee getalle se relatiewe groottes ten opsigte van mekaar (<http://www.themathpage.com/aTrig/ratio-and-proportion.htm#ratio>). Vir twee willekeurige positiewe getalle, x en y, sal die volgende dus geld:

$x:y = 1:1$ as en slegs as $x = y = 1$.

$x:y = R:1$ as en slegs as $x > y$, waar $R > 1$ en R is 'n willekeurige positiewe getal.

$x:y = T:1$ as en slegs as $x < y$, waar $T < 1$ en T is 'n willekeurige positiewe getal.

Deur weer van algebraïese beginsels gebruik te maak, word 'n liniêre sommering gedoen van alle metaboliete wat akkumuleer as gevolg van 'n gegewe ensiemdefek. Die liniêre sommering verteenwoordig die geheelbeeld. Die liniêre som kan dan op die volgende wyse voorgestel word: $(A+B+D+A_n+B_n+D_n)$.

Die liniêre som word nou in 'n verhouding gebruik teenoor metaboliet C, nl. $(A+B+D+A_n+B_n+D_n):C \gg 1$, waar $n \geq 0$ en n 'n deelversameling van willekeurige positiewe getalle is. Dit is duidelik dat $(A+B+D+A_n+B_n+D_n):C \gg 1$ (figuur 8, regter skema) 'n groter numeriese waarde sal hê as $B:C > 1$ (figuur 8, middel skema), omdat A, B, C en D nie nul mag wees nie. $(A+B+D+A_n+B_n+D_n)$ het baie duidelik 'n groter waarde as B alleen.

Die verhouding $B:C > 1$ het dit moontlik gemaak om ernstige aangebore defekte van metabolisme (homosigotiese pasiënte) te diagnoseer. In hierdie gevalle is die betrokke ensiem se aktiwiteit baie laag of totaal onaktief.

Dit kan dan moontlik wees om milde vorme (heterosigotiese- en homosigotiese pasiënte) van 'n betrokke defek op te spoor. Die benadering van $(A+B+D+A_n+B_n+D_n):C \gg 1$ kan dit moontlik maak om milde vorme (heterosigotiese en homosigotiese pasiënte) van die defek op te spoor. Met 'n milde defek, het die ensiem genoeg aktiwiteit, maar hierdie verlaagde aktiwiteit kan moontlik waargeneem word.

3.2 Keuses van metaboliete wat ingesluit is

3.2.1 Organiese sure

In tabel 1 word daar 'n uiteensetting gegee van die organiese sure van die metabolisme wat by mitochondriale β -oksidase betrokke is, ingesluit. In die

volgende paar paragrawe sal die redes en beredenering bespreek word waarom die metaboliete ingesluit is.

Tabel 1: Groeperings van metaboliete vir metabolomika studie

Ketone*	Krebssiklus Intermediêre	Tradisionele Dikarboksielsure	Ander Dikarboksielsure	Glisien-konjugate
3-OH Bottersuur	Malaat	Adiapiensuur	Glutaarsuur	Isobuturielglisien
3-OH-Iso-bottersuur	Sitroensuur	Pimeliensuur	Metiel-adiapiensuur	Isovaleriëlgliëien
2-Metiel-3-OH-Bottersuur	Akonitiensuur	Suberiensuur	2-OH-Glutaarsuur	Tigliëlgliëien
Etiëmaloonsuur	Suksiensuur	Sebasiensuur	2-OH-adiapiensuur / 3-OH-adiapiensuur	Hexanoëlgliëien
Metiëlsuksiensuur	Fumaarsuur	-	2-OH-sebasiensuur / 3-OH-sebasiensuur	Glutariëlgliëien
-	-	-	Metiel-pimeliensuur	Suberiëlgliëien
-	-	-	4-Metiel-suberiensuur	2-Metiel-buturiëlgliëien
-	-	-	-	3-Metiel-krotoniëlgliëien

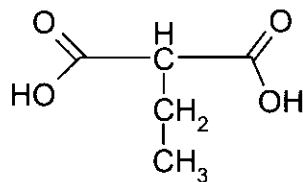
*Daar sal telkens in die teks na ketone verwys word. Dit word nie bedoel soos in organiese chemie dat daar noodwendig 'n ketoon funksionele groep gekoppel is aan die molekule nie. Dit is ook nie volgens biochemie noodwendig ketoonliggaampies nie. Dit beteken wel dat die molekules almal op een of ander manier 'n rol speel in die gevolglike metabolisme van 3-OH bottersuur.

3.2.1.1 Ketone

Ketone is die voorkeurbron van energie vir breinweefsel. Dit is die enigste substraat wat tydens vastende toestande en ten tye van abnormale energiemetabolisme verbruik kan word. Die ketone wat geanaliseer is, het 'n gemeenskaplike struktuur van 'n monokarboksielsuur, R-CHOH-CH₂-COOH met 'n OH-groep op die β-koolstof. R stel 'n alifatiese syketting voor.

Tydens vastende toestande of met abnormale metabolisme, sal ketone en strukturele analoë deur 3-OH-bottersuur dehidrogenase gekataliseer word om asetoasetaat en NADH te vorm. 3-OH-bottersuur dehidrogenase kataliseer 3-OH-monokarboksielsure waarvan die β-koolstof nie steries geblok is nie (http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?enzyme+1.1.1.30). 2-Metiel-3-OH-bottersuur is afkomstig vanaf die isoleusienkatabolisme en 3-OH-isobottersuur is afkomstig vanaf die valienmetabolisme. Beide is 3-OH-monokarboksielsure.

Etielmaloonsuur en metielsuksiensuur is beide sekondêre metaboliete wat uit die butanoaatmetabolisme vorm as butanoësuur akkumuleer. Die ensiem propioniel-KoA dekarboksilase kataliseer dan die butanoësuur as alternatiewe substraat en vorm metielsuksiensuur en/of etielmaloonsuur (Jonker, 1995).

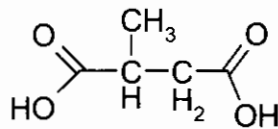


Figuur 9 : Die struktuur van etielmaloonsuur

Etielmaloonsuur en 2-metielsuksiensuur word oor die algemeen geassosieer met aangebore defekte van die metabolisme wat die Krebs-siklus en verwante energiemetabolisme beïnvloed. Daar is wel onlangs bevind dat etielmaloonsuur

'n moontlike inhibeerder van komplekse I – III van die elektrontransportketting is, sowel as die ensiem kreatienkinase (Andre *et al.*, 2006).

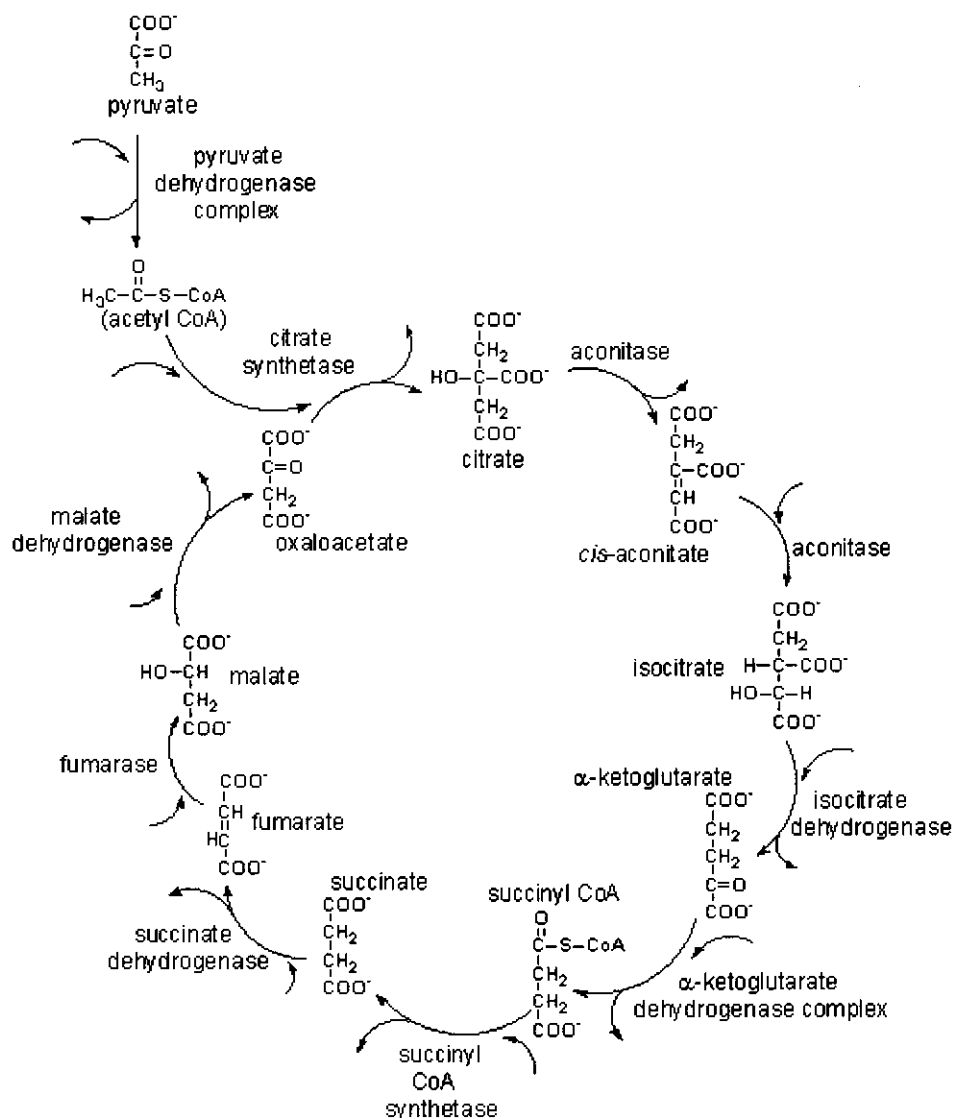
2-Metielsuksiensuur en etielmaloonsuur is beide by die ketoongroepering ingesluit weens die strukturele verwantskap aan butanoësuur.



Figuur 10 : Die algemene struktuur van 2-metielsuksiensuur

3.2.1.2 Krebsiklus Intermediêre

Die Krebsiklus gebruik asetiel-KoA om gereduseerde elektrondraers te produseer en aan die elektrontransportketting te lewer. Die siklus is ook amfibolies, met ander woorde, asetiel-KoA kan ook deur die siklus gesintetiseer word. Al die intermediêre, behalwe piruvaat, oksaloasetaat en laktaat is ingesluit. Die laasgenoemde is nie ingesluit nie, omdat hulle onstabiele organiese sure is. Piruvaat word spontaan omgeskakel na laktaat onder suur omstandighede.

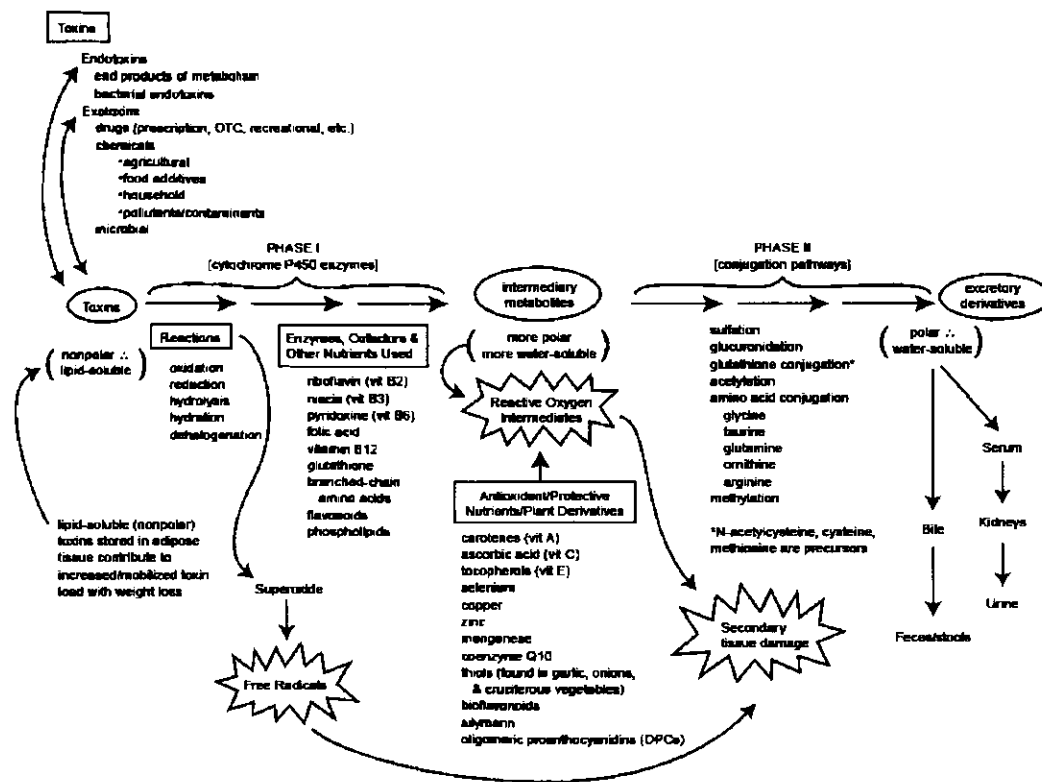


Figuur 11 : Die Krebs siklus

(<http://chemistry.gsu.edu/glactone/PDB/Proteins/Krebs/Krebs.html>)

3.2.1.3 Dikarboksielsure

Dikarboksielsure het die algemene struktuurformule van $\text{COOH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ (waar $n \geq 4$) en word gevorm deur die sitochroom p450 oksido-reduktase ensieme as deel van fase I detoksifisering (figuur 12, Fase I).



Figuur 12 : Die verskillende detoksifiseringspaaie. (fase I is die sitochroom p450 ensieme en fase II is die konjureringsensieme (Liska et al., 1998)).

Sodra 'n vetsuur 'n steriese hindernis het wat veroorsaak dat die betrokke vetsuur nie β -oksidasie kan ondergaan nie, of as daar 'n opeenhoping van vetsure in die sitoplasma voorkom, sal sitochroom p450 die vetsuur oksideer op die ω -koolstof om sodoende die vetsuur meer wateroplosbaar te maak. Die vetsuur het dan 'n karboksie-groep (-COOH) op die α - en ω -koolstof.

Die verhoogde wateroplosbaarheid van die dikarboksielsuur veroorsaak dat transport na die mitochondriale matriks kan plaasvind of dat die dikarboksielsuur deur die niere uitgeskei kan word.

Kort- en mediumketting dikarboksielsure word van die sitoplasma na die mitochondriale matriks vervoer. Konjugasie met L-karnitien is noodsaaklik vir die transport van langketting dikarboksielsure na die matriks. Binne die

mitochondriale matriks ondergaan die dikarboksielsure β -oksidasie, indien daar asetiel-KoA nodig is.

Enige funksionele groepe op die dikarboksielsuur, soos $-\text{CH}_3$ en $-\text{OH}$, sal nie β -oksidasie verhoed nie. Oksidasie sal plaasvind tot die steriese hindernis bereik word en dan sal ω -oksidasie weer plaasvind of die dikarboksielsuur sal deur die liggaam uitgeskei word.

3.2.1.4 Glisienkonjugate

Konjugering vorm deel van fase II detoksifisering (figuur 12, fase II) waar glisienkonjugate deel vorm van die aminosuurkonjugasiesisteem. Weer eens, net soos vir fase I detoksifisering, maak fase II detoksifisering die molekules wateroplosbaar sodat dit makliker uitgeskei kan word deur die liggaam.

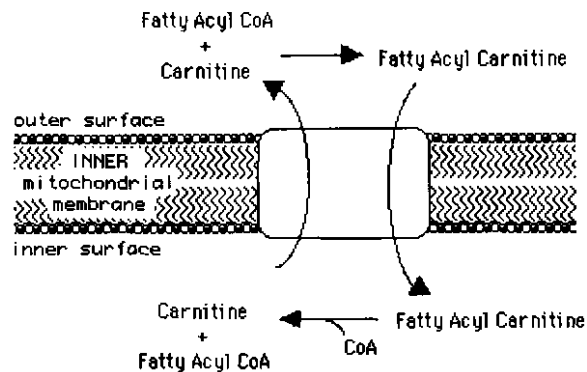
Vir glisienkonjugering om plaas te vind, moet mens ingedagte hou dat daar genoegsame vrye glisien beskikbaar moet wees vir glisienkonjugering om plaas te vind. Verder moet die molekule wat gekonjugeer moet word, geaktiveer wees. Derhalwe:



Die glisienkonjugate wat gebruik is, is hoofsaaklik afkomstig van isoleusien/leusien/valien katabolisme. 'n Defek in β -oksidasie sal daarom die vertakte ketting aminosuurkatabolisme beïnvloed. Die algemeen bekende asietglisiene en dikarboksielglisiene, wat kenmerkend is van mitochondriale β -oksidasie, is ook ingesluit.

3.2.2 Asielkarnitiene ingesluit vir die studie

Asielkarnitiene vorm om asiel-KoA na die mitochondriale matriks te transporteer (figuur 13) en om as 'n detoksifiseringsmeganisme (figuur 12, fase II) op te tree vir 'n verskeideinheid van verbindings wat toksies kan raak in hoë konsentrasies.



Figuur 13 : Die transport van langketting vetsure deur middel van L-karnitien na die mitochondriale matriks. (http://medlib.med.utah.edu/NetBiochem/mml/fa_faact.gif)

Slegs ewe kettinglengte asielkarnitiene met 'n kettinglengte van 2 tot 16 koolstowwe is vir die analise gebruik. 3-OH-buturielkarnitien, propionielkarnitien, adipielkarnitien, suberielkarnitien en karnitienkonjugate afkomstig van vertakte ketting aminosuorkatabolisme metaboliete is ook gebruik. Ongekonjugeerde L-karnitien (vrye karnitien) is slegs gebruik tydens die liniêre sommering en nie tydens die berekening van die asielkarnitienverhoudings nie.

Geen -OH asielkarnitiene is ingesluit nie, omdat asielkarnitien analyses nie goeie onderskeid kan tref tussen 'n asiel-KoA dehidrogenase defek en die ekwivalente hidroksie-asiel-KoA dehidrogenase defek nie. Ensiemanalises moet gebruik word om tussen die twee verskillende ensiemdefekte te onderskei.

3.3 Asielkarnitienverhoudings

Die konsentrasies (mmol/mol kreatinien) van die asielkarnitiene is gebruik vir die ontwerp van asielkarnitienverhoudings.

'n Asielkarnitien databasis wat hier saamgestel is, is gebruik om verwysingswaardes vir verskillende ouderdomsgroepe en geslagte te bereken. Die pasiënte met aangebore defekte van vetsuurkatabolisme was bevestigde heterosigotiese en homosigotiese defekte. Die proefpersone wat aan 'n L-karnitien beladingstudie deelgeneem het, se resultate is ook gebruik.

Die berekenings vir die asielkarnitienverhoudings is ontwerp deur die metabolisme vir elke aangebore defek in ag te neem. Die substraat- en produkmetaboliete vir elke defekte ensiem/ ensiemnetwerk van belang, is eerste in berekening gebring en dan is die sekondêre en indirekte metaboliete in berekening gebring. In sekere gevalle is daar metaboliete ingesluit by die asielkarnitienformule wat nie noodwendig direk verband hou met die betrokke metabolisme weg nie, maar wel 'n gemeenskaplike tendens in afname of toename getoon het vir die groep pasiënte.

Die metaboliete is in verhoudings ten opsigte van mekaar uitgedruk. Die individuele metabolietverhoudings is dan met mekaar vermenigvuldig.

Wiskundige aanpassing van die verhoudings is dus gedoen om elke defek uniek te probeer uitlig met behulp van sy ontwerpte formule. Die wiskundige manipulerings is gedoen met die aanname dat dit bekend is watter pasiënte heterosigoties, homosigoties en metabolismes normaal is. Die asielkarnitienformules is dan ook so gemanipuleer dat slegs die homosigotiese pasiënte uitgelig word.

Die asielkarnitien databasis, wat gebruik is om die asielkarnitienformules te ontwerp, bestaan uit data van normale-, heterosigotiese- en homosigotiese pasiënte. Met die ontwerp van elke formule is die wiskundige terme verander en eksponente gebruik om die finale formule te verkry. Byvoorbeeld, gestel twee willekeurige metaboliete se konsentrasies word gegee deur A en B respektiewelik. A sal die substraat en B die produk vir 'n betrokke ensiem wees. Indien die ensiem defek is, sal A se konsentrasie toeneem en B se konsentrasie konstant bly of afneem. Die verhouding van $A:B > 1$ wees, en kan ook uitgedruk word as A/B . Gestel daar is 'n sekondêre metaboliet met konsentrasie C en die metaboliet ontstaan weens die detoksifisering van A, dan kan $C:B$ (C/B) ook verhoog en moontlike diagnostiese betekenis hê. Aangesien A en C se waardes sal toeneem in die geval van 'n defek en omdat hulle strukturele analoë is of betrokke is by dieselfde metabolisme kan ons sê dat $(A + C):B > 1$ is. As ons al die terme saamvoeg, lyk die formule soos volg:

$$(A + C) \times (A/B) \times (C/B) > 1 \text{ waar } A, B, \text{ en } C \text{ positiewe reële getalle is.}$$

Verder kan daar dan van eksponente gebruik gemaak word as diskriminante om die formule meer spesifiek te maak vir die homosigotiese pasiënte met die betrokke defek. Die formule mag dan soos volg lyk:

$$(A + C) \times (A/B)^N \times (C/B)^M > 1, \text{ waar } A, B, C, M \text{ en } N \text{ positiewe reële getalle is.}$$

Tydens die wiskundige aanpassing van die formules, is die pasiëntdata nie altyd spesifiek uitgelig vir die betrokke defek se formule nie. Die eksponente is dan ingevoeg en op 'n toetsbasis willekeurig verander om sodoende 'n uitheffingseffek te hê op die pasiënte van belang en 'n uitdowingseffek op alle ander pasiënte.

Daar moet in gedagte word, dat die asielkarnitienverhoudings slegs voorgestelde formules is en, sover bekend, is daar geen ekwivalente formules in die literatuur

beskryf nie. Die hoofdoel van die asielkarnitien formules was om plaaslike diagnose en onderskeid van pasiënte met aangebore defekte van vetsuurkatabolisme te vergemaklik. In die volgende paar paragrawe sal die formules vir spesifieke vetsuurdefekte en sekere medikasies bespreek word. Die beredenering vir die ontwerp en moontlike toepassing van die formule sal ook bespreek word.

Daar word van afkortings en wiskundige terme gebruik gemaak vanuit die volgende lys:

Σ	→	Die liniêre som van
[]	→	Konsentrasie van (mmol/mol kreatinien)
AsetielKar	→	Asetielkarnitien
PropionielKar	→	Propionielkarnitien
ButurielKar	→	Buturielkarnitien
GlutarielKar	→	Glutarielkarnitien
GlutakonielKar	→	Glutakonielkarnitien
3OHButKar	→	3-OH Buturielkarnitien
TotAsielKar	→	Totale liniêre som van asielkarnitiene
C6Kar	→	Heksanoïelkarnitien
C8Kar	→	Oktanoïelkarnitien
C10Kar	→	Dekanoïelkarnitien
C12Kar	→	Dodekanoïelkarnitien
C14Kar	→	Tetradekanoïelkarnitien
C16Kar	→	Hexadekanoïelkarnitien
CC12Kar	→	Onversadigde 12 koolstof langketting vetsuur
CC14Kar	→	Onversadigde 14 koolstof langketting vetsuur
CC16Kar	→	Onversadigde 16 koolstof langketting vetsuur

3.3.1. Glutaarsuururie Tipe II (Meervoudige Asetiel-KoA-dehidrogenase defek)

Die verhouding van glutarielkarnitien tot glutakonielkarnitien het potensiële diagnostiese betekenis, aangesien glutariel-KoA omgeskakel word na glutakoniel-KoA deur glutariel-KoA dehidrogenase. 'n Defek van die glutariel-KoA dehidrogenase ensiem sal 'n verhoging in glutariel-KoA en verlaging in glutakoniel-KoA konsentrasies tot gevolg hê. Weens die aard van glutaarsuururie tipe II, sal 'n heterogene versameling van dehidrogenase ensieme geaffekteer wees.

Buturielkarnitien is ingesluit omdat die butanoaatmetabolisme sal kompenseer vir die dehidrogenase ensiemdefekte en meer 3-OH-bottersuur probeer sintetiseer, maar weens die dehidrogenases wat defek is, sal die metabolisme verskuif na die akkumulاسie van butanoaat. Verder is propionielkarnitien ingesluit. Tydens ongewone of abnormale metabolisme sal die liggaam die vertakte ketting aminosure gebruik om propioniel-KoA te sintetiseer, wat omgeskakel kan word na suksiniel-KoA wat aan die Krebs siklus gelewer kan word vir asetiel-KoA produksie. Oktanoiëlkarnitien is ingesluit want die glutaarsuururie tipe II pasiënte toon oor die algemeen 'n groter afname in dié vetsuurkonsentrasie as die ander vetsure.

Die liniêre som van die totale asielkarnitiene is gebruik om die globale effek van die betrokke defek op die vetsuurkatabolisme te weerspieel. Glutarielkarnitien is in verhouding ten opsigte van glutakonielkarnitien ($\frac{[\text{Glutariel}]}{[\text{Glutakon}]}$) uitgedruk. Verder is buturielkarnitien uitgedruk teenoor propionielkarnitien. Buturielkarnitien sal akkumuleer as gevolg van die defek en propionielkarnitien sal afneem weens verhoogde suksinaatsintese vanaf vertakte ketting aminosuurkatabolisme. Dit is moontlik 'n goeie aanduiding van die verskuiwing in energiemetabolisme.

Die asielkarnitienformule is verder met behulp van eksponente gemanipuleer om sodoende te verseker dat slegs die Glutaarsuururie Tipe II pasiënte se waardes uitgelig word. Die eksponente is verder self ook so verander tot die asielkarnitienformule 'n dimensielose waarde gegee het. Die eksponente is willekeurig verander todat die asielkarnitienformule die verwagte resultate gelewer het.

Die asielkarnitien verhouding vir glutaarsuururie tipe II sien soos volg daaruit:

$$\frac{([\text{GlutarielKar}]/[\text{GlutakonKar}]^{1.5}) \times ([\text{ButurielKar}]/[\text{PropionielKar}])^{1.5}}{([\text{TotAsielKar}]^{0.6}/[\text{C8Kar}]^{0.1})}$$

3.3.2 Langketting Asiel-KoA-dehidrogenase defek (LCADD)

Die verhouding van [C12]/[C10] word plaaslik gebruik om LCADD te diagnoseer. Die bestaande databasis het pasiënte wat valproaatbehandeling ontvang het, ingesluit. Valproaat kan LCADD induseer en met die asielkarnitienverhouding wat gebruik is, is die LCADD- sowel as die valproaatpasiënte positief gediagnoseer. Die eerste ideaal van die ontwerp van die nuwe asielkarnitienformule was om LCADD uit te lig en die gevolglike uitsluiting van valproaatpasiënte.

Die LCADD asielkarnitienverhouding is ontwerp, al was heterosigote met LCADD nie beskikbaar vir die studie gewees nie. Tydens diagnose is dit soms moeilik om te onderskei tussen MCADD en LCADD omdat daar oorvleueling is van merkermetaboliete (C10 vetsure en dikarboksielsure). Die tweede ideaal was dus om 'n formule te ontwerp wat sou kon onderskei tussen pasiënte met MCADD en LCADD.

Daar is 'n liniêre sommering gedoen vir vetsure met kettinglengte van 12 tot 16 koolstowwe (C12 tot C16) asook die onversadigde langketting vetsure (CC12 tot

CC16). Die onversadigde langkettingvetsure is in berekening gebring omdat daar 'n vermoede was dat dit 'n effek kan hê op die valproaatdata. Die valproaatpasiënte se data het lae konsentrasies getoon van onversadigde langketting vetsure.

Die verhouding van asietielkarnitien tot propionielkarnitien is in berekening gebring omdat die mediumketting en kortketting vetsure β -oksidase kan ondergaan om asietiel-KoA te vorm. Die vertakte ketting aminosuorkatabolisme sal in die geval moontlik nie soveel gebruik word vir propioniel-KoA produksie en suksinaat sintese nie. Die resultaat kan dan moontlik 'n goeie beeld verskaf van die totale energiemetabolisme.

Die formule is onderwerp aan wiskundige manipulasie met behulp van eksponente om weer eens slegs die betrokke defek onder beskouing uit te lig. 'n Sekondêre doel van die eksponente was om die asielkarnitienformule dimensieloos te maak. Die formule vir LCADD sien soos volg daaruit:

$$\begin{aligned} & \Sigma([C12Kar], [C14Kar], [C16Kar], [CC12Kar], [CC14Kar], [CC16Kar]) \times \\ & ([C16Kar]/[C14Kar])^{0.5} \times ([C12Kar]/[C14Kar])^{0.5} \times ([CC14Kar]^{0.5}/[CC16Kar]^{1.5}) \\ & \times ([AsetielKar]/[PropionielKar]) \end{aligned}$$

3.3.3 Mediumketting-asiel-KoA-dehidrogenase defek (MCADD)

Volgens die literatuur word die oktanoïelkarnitien tot dekanoïelkarnitien verhouding (C8:C10) en die oktanoïelkarnitien tot asietielkarnitien verhouding (C8:C2) as die beste diagnostiese benaderings beskou om MCADD te diagnoseer en word die diagnose met opvolg molekulêre tegnieke bevestig (Hoffmann *et al.*, 2002). Plaaslik word die C6:C8 verhouding by voorkeur gebruik. Die verhoudings van C6, C8 en C10 kan ook moontlik gebruik word.

Die gebruik van C10 kan moontlike probleme gee omdat C10 'n substraat is vir MCAD en LCAD.

Net soos vir die LCADD formule is daar 'n liniêre sommering gedoen van die betrokke metaboliete (C6 tot C10) waarna dit met verhoudings tussen die onderlinge asielkarnitiene vermenigvuldig is.

Die plaaslike verhouding van [C6]:[C8] is in die berekening gebring. Die formule was egter verbeter deur die inverse vorm ([C8]:[C6]) te gebruik. Die verhouding van [C6]:[C10] het 'n beter uitliggingseffek gehad vir MCADD as die verhouding van [C10]:[C6] en [C8]:[C10].

Die asielkarnitien tot totale asielkarntienverhouding is gebruik omdat die asiel-KoA vlakke 'n direkte weerspieëling is van die energiemetabolisme in die liggaam. Langketting vetsure, kortketting vetsure en vertakte ketting aminosuurkatabolisme kan moontlik bydra tot die asielkarnitien- en totale asielkarnitienkonsentrasies.

Die formule is dimensieloos en (soos in die vorige gevalle) is verhoudings en eksponente gebruik om die formule spesifiek te ontwerp om die defek se diagnose te versterk.

Die MCADD formule sien soos volg daaruit:

$$\frac{([C6Kar], [C8Kar], [C10Kar]) \times ([C8Kar]^{2.5}/[C6Kar]^{1.5}) \times ([C6Kar]^{0.5}/[C10Kar]^{1.5}) \times ([AsetielKar]^{2.5}/[TotAsielKar]^{3.5})}{}$$

3.3.4 Statiene verhouding

Statiene is HMG-KoA reductase inhibeerders en word algemeen gebruik om cholesterol te verlaag en die HDL/LDL verhouding te verander, sodat dit minder aterogenies is. Met organiese suuranalises op die GC-MS is daar duidelike interferensie as gevolg van statienmedikasie.

Die aard van statiene as medikasie, beïnvloed beide vetsuuranabolisme en vetsuurkatabolisme en veroorsaak 'n groot versteuring op metabolietvlak (Blizkanov, 2002).

Daar kon dus nie onmiddellik metaboliete uitgesonder word vir die ontwerp van die asielkarnitienformule nie. Derhalwe is willekeurig gebruik gemaak van verskillende asielkarnitiene in die formule. Eksponente is gebruik om spesifisiteit te verhoog en om die formule dimensieloos te maak.

$$\left\{ \left(\frac{[C6Kar]}{[C8Kar]} \right)^2 \times \left(\frac{[AsetielKar]}{[3OHButKar]} \right)^{0.5} \times \left(\frac{[PropionielKar]}{[TotAsielKar]} \right)^{0.5} \right\} [ButurielKar]^{0.5}$$

HOOFSTUK 4

MATERIALE EN METODEDES

4.1. Urienmonsters vir studie

Uriene van 25 normale proefpersone is gebruik. Die individue is almal tussen 24 tot 36 jaar oud manlik. Hiervan was 22 blankes en 3 nie-blankes. Elke proefpersoon is ondersoek om te verseker dat geeneen aan enige bekende aangebore defek van metabolisme ly nie.

'n Vaste dieet (bylaag D) is vir 14 dae lank aan elke proefpersoon verskaf. Die proefpersone het elke oggend vroeg gerapporteer by die hospitaal om 'n kospakkie vir die dag te ontvang. Daarna is hulle terug werk of huis toe. Op die sewende dag is die eerste urienmonster (T0) onder toesig versamel. Daarna is L-karnitiesien (200mg) ingeneem en 24 uur later, op dag 8, is die tweede urienmonster (T2) onder toesig geneem. Vanaf dag 8 tot dag 14 het die proefpersone elke dag 200mg L-karnitiesien ingeneem en op dag 14 is die derde urienmonster (T3) geneem. Alle L-karnitiesien supplementerings is oraal ingeneem.

Daar is praktiese probleme wat kan ontstaan, deur net manlike proefpersone te gebruik, weens die moontlike verskil in metabolisme wat tussen geslagte kan voorkom. Tydens die beplanning van die studieprotokol het die mediese dokter betrokke nie voorsiening gemaak vir vroulike proefpersone nie. Gevolglik was daar nie uriene beskikbaar vir vroulike proefpersone nie. In Hoofstuk 8 sal toekomstige protokol idees bespreek word vir soortgelyk studies.

Pasiënte met aangebore defekte van mitochondriale β -oksidasie, asook hulle familieledede, se resultate is van die databasis van die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte (Skool vir Biochemie, Potchefstroomkampus van die

Noordwes-Universiteit) verkry. Om goed vergelykbare resultate te verseker, is slegs pasiëntdata gebruik wat na 2002 versamel is.

4.2 Kreatinienbepaling

Kreatinienbepalings is gedoen by die plaaslike patologielaaboratorium (Ampath Drs Du Buisson, Bruinette & Kramer, Potchefstroomtak) volgens die Jaffe reaksie. Die kreatinienwaarde word met 'n konstante, 11.312, vermenigvuldig om 'n waarde te verkry in mg%. Die volume uriene wat gebruik moet word vir die organiese suur ekstraksie, word volgens die kreatinienwaarde bepaal:

Kreatinien > 100mg% word 0.5mL uriene gebruik.

Kreatinien < 100mg% word 1mL uriene gebruik.

Kreatinien < 5mg% word 2mL uriene gebruik.

Kreatinien < 2mg% word 3mL uriene gebruik.

4.3 Organiese suur ekstraksie en voorbereiding

Organiese sure is geëkstraheer deur middel van vloeistof-vloeistof ekstraksie. Die volume uriene, bereken in 3.2, is in 'n groot kimaxbuis gegooi en aangesuur na pH=1 met 5N HCl.

Die interne standaard, fenielbottersuur (Sigma, # 27987-0), is bygevoeg in 'n volume, bepaal deur 5 x kreatinien mg% (soos bepaal in 4.2). Die eerste ekstraksie word met behulp van 6mL etielasetaat (Merck #BB101086J) gedoen waartydens die monster geroteer (Cole & Parmer Roto-Torque # 7637-10) word vir 20min. Daarna word die monster gesentrifugeer (Optolabour, Securita) vir 3min teen 2000rpm en die organiese fraksie word versigtig afgesuig. Die organiese fraksie word dan in 'n skoon kimaksbuis geplaas.

Die tweede ekstraksie word met 3mL di-eteleter (Merck, #BB100946B) gedoen en vir 10min geroteer gevolg deur sentrifugering vir 3min by 2000rpm. Die organiese fraksie word weer eens versigtig afgesuig. Die twee organiese fraksies word dan gekombineer.

Na₂SO₄ (Merck, # BB102644V) word by die organiese fraksies gevoeg om oortollige water te verwyder. Die ekstrak word dan by kamertemperatuur onder stikstof gedroog vir ongeveer 40min.

Derivatisering word gedoen met die derivatiseringsreagense BSTFA (N,_o-Bis-Trimetielsiliel-trifluoroasetamied), TMCS (trimetielchlorosilaan) en piridien by 70°C vir 45min. Die volume derivatiseringsreagens wat gebruik word, is bereken met die volgende formule: BSTFA (μL) is 3 x kreatinien mg% en die volume TMCS (μL) is 0.6 x kreatinien mg%.

Die GC-MS opstelling het bestaan uit 'n HP (Hewlett Packard) 6890 gaschromatograaf en 'n HP 5973 massaspektrometer. Die kolom wat gebruik is, is 'n Optima 1-MS Agilent 122-0132 (Agilent Technologies). 'n Geautomatiseerde monster inspuitsisteen (Agilent Technologies 7683 Series) is gebruik om die monsters in te spuit.

Die gaschromatograaf se aanvanklike temperatuur was 60°C vir 2min. Daarna is dit na 120°C verhoog teen 'n tempo van 4°C/min. Daarna is dit verder verhoog na 285°C teen 6°C/min. Een μL monster word '*splitless*' ingespuut in die kolom by 280°C teen 'n druk van 17.27psi vir 'n vloeitempo van 2mL/min (met helium as draergas) deur die kolom. Die massaspektrometer se bron is konstant by 'n temperatuur van 280°C gehou. Skandering het geskied vanaf 50 – 550 atomiese massa eenhede (amu). Na analise is die gaschromatograaf geprogrammeer om na 295°C te styg en konstant te bly vir 1min. Die totale tyd was 48min per analise.

Die verkrygte data is gedekonvoleer met behulp van die sagteware pakket Nist AMDIS™ (<http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis>). Die verwerkte AMDIS data is vervolgens oorgedra na MS-Excel™. Die konsentrasies van die organiese sure is bereken en met normaalwaardes vergelyk. Die formule vir konsentrasieberekening, sien soos volg daaruit:

$$\text{mg/g Kreatinien} = (\text{Piek area van organiese suur} / \text{Piek area van interne standaard}) \times 262.5$$

$$\text{mmol/mol Kreatinien} = (\text{mg/g Kreatinien}) / (\text{Mr [Verbinding]})$$

4.4 Asielkarnitien voorbereiding en analise op die LC-MSMS

Die interne standaard is voorberei deur 410µL isotoopmengsel (laboratorium samestelling) en 'n 100µL Pickering (Anatech Institute) te meng in 'n eppendorfbuis. Die interne standaard word presies soos die urienmonsters na eerste sentrifugering hanteer.

Die isotoopmengsel het bestaan uit die volgende isotope (*m/z* is massa per lading):

L-karnitien (*m/z* 221)

Asetielkarnitien (*m/z* 263)

Propionielkarnitien (*m/z* 277)

Isovalerielkarnitien (*m/z* 311)

Oktanoïelkarnitien (*m/z* 347)

Palmitoïelkarnitien (*m/z* 459)

100µL uriene word in 'n eppendorfbuis gesentrifugeer (Kendro Lab Products, Heraeus Biofuge *pico*) vir 20min by 13000 rpm waarna 10µL van die supernatant

uriene oorgedra word na 'n tweede, skoon eppendorfbuis. Dan word 410 μ L van die isotoopmengsel bygevoeg in die tweede eppendorfbuis en dan weer eens gesentrifugeer by 20min teen 13000 rpm. Die supernatant word dan volledig oorgedra na 'n derde eppendorfbuis en gedroog met stikstof vir 60-90 min by 65°C.

Die gedroogte monster is dan met butanoliese-HCl gebutyleer en weer gedroog onder stikstof vir 60min by 65°C. Na die laaste drogingstap is 100 μ L van 'n 20:80 verhouding ddH₂O:Asetonitriël (Merck, #BB152516Q) met 1% mieresuur (Merck, #2438000LC) by die gedroogte monster gevoeg.

'n HP 1090 Series II hoëdruk vloeistofchromatograaf was gekoppel aan 'n VG Quattro II 4000 tandem massaspektrometer. Positiewe elektronsproei ionisasie is gebruik met behulp van 'n geautomatiseerde monster inspuitsisteem (Waters 2777 Sample Manager). Die monstervolume van 25 μ L is direk ingespuut in die elektronsproeibron teen 'n tempo van 10 μ L/s.

Die konfigurasie van die tandem massaspektrometer was die volgende: Die eerste massaspektrometer het geskandeer vir moederione oor 'n massagebied van m/z 210 – 580. Argon is as botsingsgas gebruik teen 'n druk van 3.0×10^{-3} mBar. Die tweede massaspektrometer is op staties gestel om vir 'n karakteristieke dogterioon van m/z 85 te skandeer. Stikstof is as 'n nebuleringsgas teen 500L/uur gebruik, terwyl die kapilêre sproei op 50L/uur gestel is. Die potensiaalverskil oor die kapilêr was 3.20kV en die konieselensspanning was 35V. Die botsingsenergie was 25eV. Beide massaspektrometers se resolusie is gestel na 13.5.

Die verkrygte data is deur MassLynx™ verwerk en omskep na 'n verdere verwerkbare vorm vir in-huis makro's in MS-Excel™ en MS-Access™. MassLynx™ is 'n sagtewarepakket wat verskaf is saam met LC-MSMS apparaat.

4.5 Statistiese verwerking

Aangesien die oorspronklike data nie vergelykbaar was nie, is die verskil tussen die tye wanneer die urienmonsters versamel is (T0, T2 en T3) per individu bereken (Hoofstuk 5). Die gemiddeldes en die standaardafwykings vir die verskille is dan bereken. Alle statistiese teorieë, berekeninge en verklarings is gedoen met die hulp van Dr. Suria Ellis (Statistiese Konsultasie Dienste Potchefstroomkampus, Noordwes-Universiteit).

Die T-toets word dan gebruik om te toets of die gemiddelde verskille in die verskillende tye ná karnitiesbelading statisties betekenisvol was. Die p-waarde is ook aangepas na die Bonferroni p-waarde, wat 'n baie strengere maatstaf is van statistiese betekenisvolheid. Die Bonferroni p-waarde word soos volg bereken:

$$\text{Bonferroni p-waarde (p}_B\text{)} = \text{p-waarde} \times \text{aantal verskille}$$

Waar	p-waarde	→	bepaal deur die T-toets.
	Aantal verskille	→	die hoeveelheid verskille wat bepaal word tussen verskillende metings.

In al die grafieke is die gemiddeld \pm 95% vertrouensinterval gebruik om die data te normaliseer in verhouding met die aantal pasiënte (Dr. Suria Ellis, Statistiese Konsultasie Dienste, Potchefstroom-kampus, Noordwes-Universiteit). Die vertrouensinterval is soos volg bereken vir $n = 25$:

$$95\% \text{ Vertrauensinterval} = \pm 2.064 \times (\text{Standaardafwyking} / n^{0.5})$$

Verder, in Hoofstuk 6, is daar met die liniêre sommering van metaboliëte sowel as die ontwerpte asielkarnities vergelykings 'n praktiese effek in berekening gebring. Statisties betekenisvolle verskille beteken nie altyd dat daar 'n praktiese waarde aan die data geheg kan word nie. Die p-waarde neem af in die

meerderheid van gevalle hoe groter die datastel word en kan 'n minder akkurate beeld van die data weergee.

Die praktiese effek bereken die verskil tussen datastelle op só 'n wyse dat die berekende verskil onafhanklik is van eenhede en die grootte van die datastel. Die praktiese effek bring ook die verspreiding van die data in berekening. In die geval waar die datastelle verskillende n-waardes het, sal die praktiese effek tesame met 'n vertrouensinterval die data meer betekenisvol intrepreteer; data wat nie statisties betekenisvol is nie, maar wel prakties betekenisvol dui op 'n aansienlike verskil. Die praktiese effek is:

$$d = (|x_1 - x_2|) / s_{max}$$

Waar	d	→	praktiese effek grootte
	x_n	→	gemiddeld, $n = 1, 2, \dots, \infty$
	s_{max}	→	maksimale standaardafwyking tussen die twee gemiddeldes waarvoor praktiese effek bepaal word.
As	$d \leq 0.2$	→	Geen praktiese effek nie
	$2 < d \leq 5$	→	Aansienlike praktiese effek
	$5 < d \leq 8$	→	Duidelike praktiese effek

HOOFSTUK 5

RESULTATE EN BESPREKING VAN KARNITIENBELADINGS OP PROEFPERSONE

5.1 Resultate en bespreking

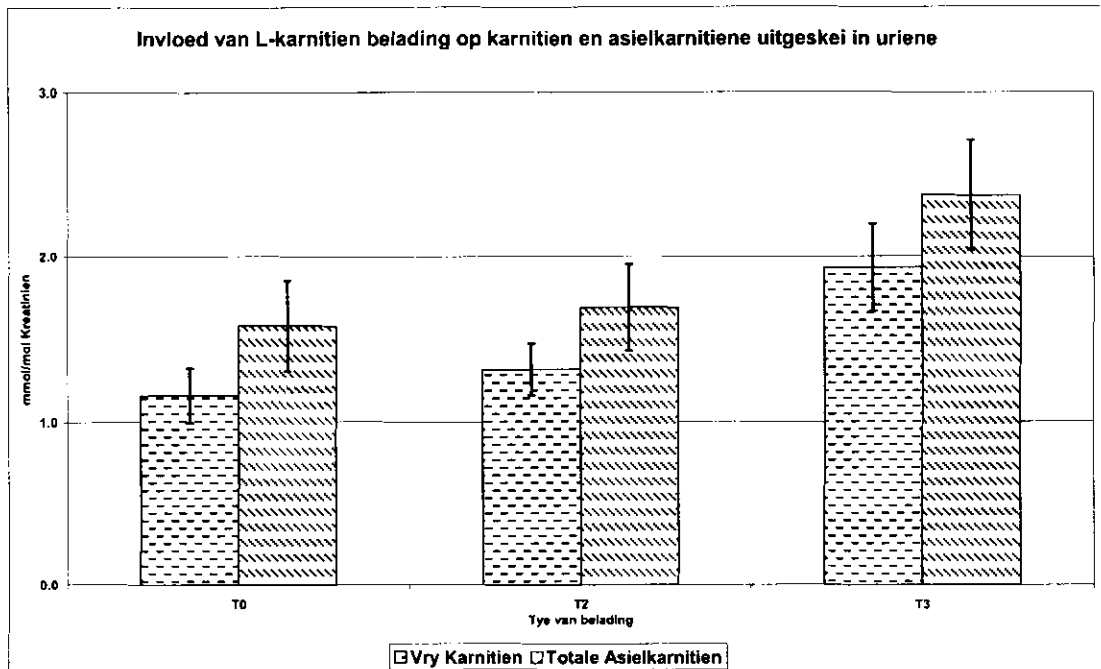
Alle Bonferroni p-waardes (p_B), standaardafwykings en vertrouensintervalle word in bylae A en B gegee.

Die T0 waarde in hierdie hoofstuk is in hoofstuk 6 gebruik as die basislyn om met pasiënte (hetero- en homosigote) met aangebore defekte van β -oksidase te vergelyk. Alle waardes vir die grafieke word in tabelle weergegee in bylaag C.

5.1.1 Karnitiene en asielkarnitiene uitgeskei in uriene

Die maksimumuitskeiding van L-karnitien en asielkarnitien vind 14 dae (T3) na belading (figuur 14) plaas en T3 (1.931 mmol/mol Kreatinien en 2.374 mmol/mol kreatinien vir vrye karnitien en totale asielkarnitien, respektiewelik) gee vir beide metabolietgroeperings die enigste statisties betekenisvolle verskil in konsentrasie.

Soogdiere het 'n intrasellulêre- en ekstrasellulêre L-karnitien poel wat uit vrye L-karnitien en 'n verskeidenheid asielkarnitiene bestaan (Rebouche, 2004). Homeostase van die poel geskied deur verskeie sellulêre meganismes vir die handhawing van 'n streng konsentrasie gradiënt tussen die intrasellulêre en ekstrasellulêre poel (Rebouche *et al.*; 1998; Rebouche, 2004). Die proefpersone wat aan hierdie beladingeksperiment deelgeneem het, was almal normaal en daar behoort dus nie 'n tekort aan L-karnitien in die liggaam te wees



Figuur 14 : Die invloed van L-karnities belading en uitskeiding van karnitiesmetaboliete. T0, T2 en T3 stel onderskeidelik geen karnitiesbelading (T0), 24 uur na karnitiesbelading (T2) en na 7 dae van karnities (T3) belading voor. $p_B < 0.05$ vir Vrye Karnities en Asielkarnities na die tweede uriemonster na belading (T3). Waardes is gemiddeld en 95% VI, $n = 25$.

nie. Met 'n goeie dieet kan die liggaam self genoegsame l-karnities sintetiseer (Mitchell, 1978).

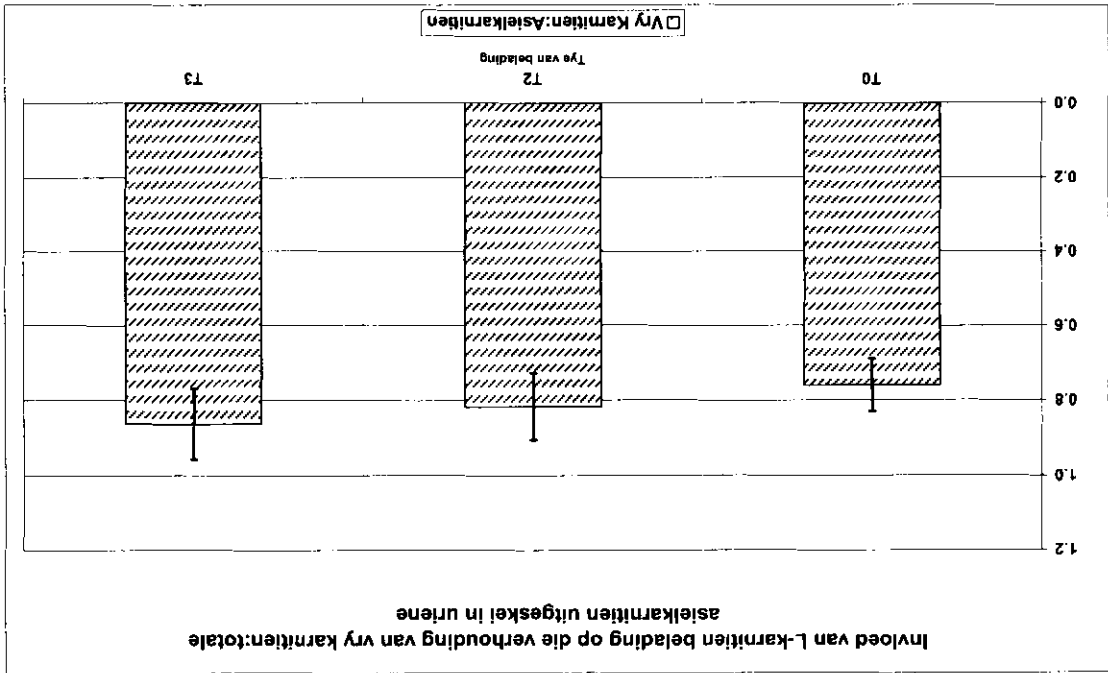
Die eerste L-karnitiesbelading op dag 7 (T2) kan beskou word as 'n akute toediening en die toediening van dag 8 na dag 14 (T3) kan beskou word as kroniese toediening. Weens die halfleeftyd van L-karnities in die liggaam (15 ure volgens Kelly, 1998) het die kroniese toediening 'n akkumulerende effek gehad in vergelyking met die akute toediening.

Kroniese binnearse L-karnities belading lei tot 'n toename in die plasma (Kelly, 1998) en spierweefsel (Rebouche, 1998; Rebouche, 2004) konsentrasies van L-karnities. Ná akute binnearse toediening van L-karnities, is gevind dat daar 'n

Die algemeen aanvaarde dosis wat gebruik word vir L-karnitien suplementering wissel van 500mg/dag tot 6000mg/dag (Rebouche, 2004) waar die proefpersone 'n enkelvoudige 200mg ontvang het. 'n Lae orale dosis van L-karnitien bevorder die oksidasie van langketting- en mediumketting vetsure na kortketting vetsure, veral asielkarnitien en butiërlkarnitien (Akçetin et al., 1987).

Verandering in vetsuurkatabolisme was, maar weens die regulering van die endogene L-karnitienpoel het die L-karnitienkonsentrasies in die spiere onveranderd gebly (Brass et al., 1998). Die bio beskikbaarheid van orale L-karnitien wissel van 14% tot 18% (Rebouche, 2004) en daar kan dus afgelei word dat orale toediening van L-karnitien nie so 'n merkwaardige toename sal toon in die endogene poel soos binnearse toediening nie.

Figuur 15 : Die invloed van L-karnitien belading op die verhouding van vrye karnitien:totale asielkarnitien uitgeskeel in die urine. T0, T2 en T3 stel onderskeidelik geen karnitienbelading (T0), 24 uur na karnitienbelading (T2) en na 7 dae van karnitien (T3) belading voor. $p_a > 0.05$. Waardes is gemiddeld en 95% VI, n = 25.



Die verhouding van die vrye karnities tot asielkarnities het vir alle praktiese doeleindes konstant gebly (figuur 15) wat daarop dui dat die persone normaal is en geen aangebore defekte van vetsuurkatabolisme gehad het nie. Die hoeveelheid asielkarnities wat in die uriene uitgeskei is, het in verhouding toegeneem tot die vrye karnities wat uitgeskei is. Die verskynsel kan verklaar word deur die redenasie te gebruik dat die streng regulering van die endogene L-karnitiespoel, oortollige L-karnities sal uitskei in die uriene. Die toename in totale asielkarnities sal dan wees as gevolg van die stimulerende effek wat lae dosisse L-karnities het op vetsuurkatabolisme.

'n Moontlike defek sou aangetoon word as meer vrye karnities gebruik word vir detoksifiseringsdoeleindes en die verhouding verander. In sulke gevalle sou die vrye karnitieskonsentrasie daal en die asielkarnitieskonsentrasie styg.

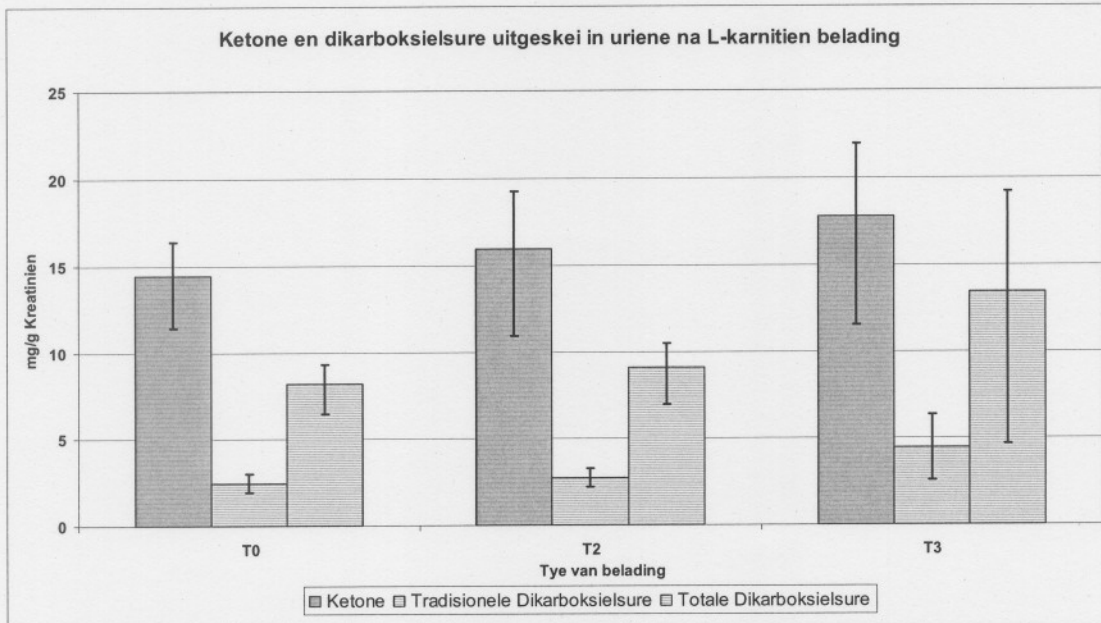
Die resultate in figuur 14 (T3) word deur die literatuur ondersteun, deurdat 'n kroniese suplementering met 'n relatiewe lae dosis L-karnities moontlik 'n meer duidelike effek op vetsuurkatabolisme en die endogene L-karnitiespoel kan hê.

By T2, figuur 14 en 15, kan gesien word dat daar nie 'n noemenswaardige verskil was na 'n akute belading nie en vanuit die literatuur is die moontlike verklaring dat akute toediening geen merkwaardige verandering meebring in die endogene poel van L-karnities nie.

5.1.2 Organiese sure uitgeskei in die uriene

5.1.2.1 Ketone en dikarboksielsure

Daar was geen statisties betekenisvolle veranderings in konsentrasies van ketone of dikarboksielsure in die uriene nie (figuur 16). Die ketoongroepering en



Figuur 16 : Ketone en dikarboksielsure uitgeskei in uriene na L-karnitien belading. T0, T2 en T3 stel onderskeidelik geen karnitien belading (T0), 24 uur na karnitien belading (T2) en na 7 dae van L- karnitien (T3) belading voor. Daar het geen statisties betekenisvolle verskille oor die geheel plaasgevind nie ($p_B > 0.05$). Waardes word gegee as gemiddeldes en 95% VI, $n = 25$.

die dikarboksielsure (figuur 16, Ketone) het effe toegeneem met L-karnitienbelading. Die invloed van L-karnitienbelading op ketogenese en dikarboksielsuursintese is beide omstrede onderwerpe in die literatuur.

L-karnitien in lae dosisse (dosis < 500mg/dag) stimuleer ketogenese (Aksetin *et al.*, 1987; Mitchell, 1978). Hoë dosisse (500mg/dag < dosis < 6000mg/dag) het 'n inhiberende effek (Aksetin *et al.*, 1987). Die dosis L-karnitien, wat gebruik is vir die belading, was relatief laag en stem dus ooreen met wat in die literatuur aanvaar word. 3-OH-bottersuur het die grootste bydrae gelewer tot die liniêre sommering. Die strukturele analoë van 3-OH bottersuur het 'n geringe bydrae gehad. Dit kan moontlik verklaar word omdat die metabolisme normaal was en geen alternatiewe bronne van energie benodig is nie.

Die tempo van β -oksidasie word deur die intramitochondriale konsentrasie verhoudings van [NADH]/[NAD], [ATP]/[ADP] en [asetiel-KoA]/[KoA] bepaal (Dunlop *et al.*, 1986). Op 'n soortgelyk wyse word ketogenese beheer deur die [NADH], [asetiel-KoA]/[KoA] en 3-OH-bottersuur konsentrasies (<http://web.indstate.edu/thcme/mwking/fatty-acid-oxidation.html>).

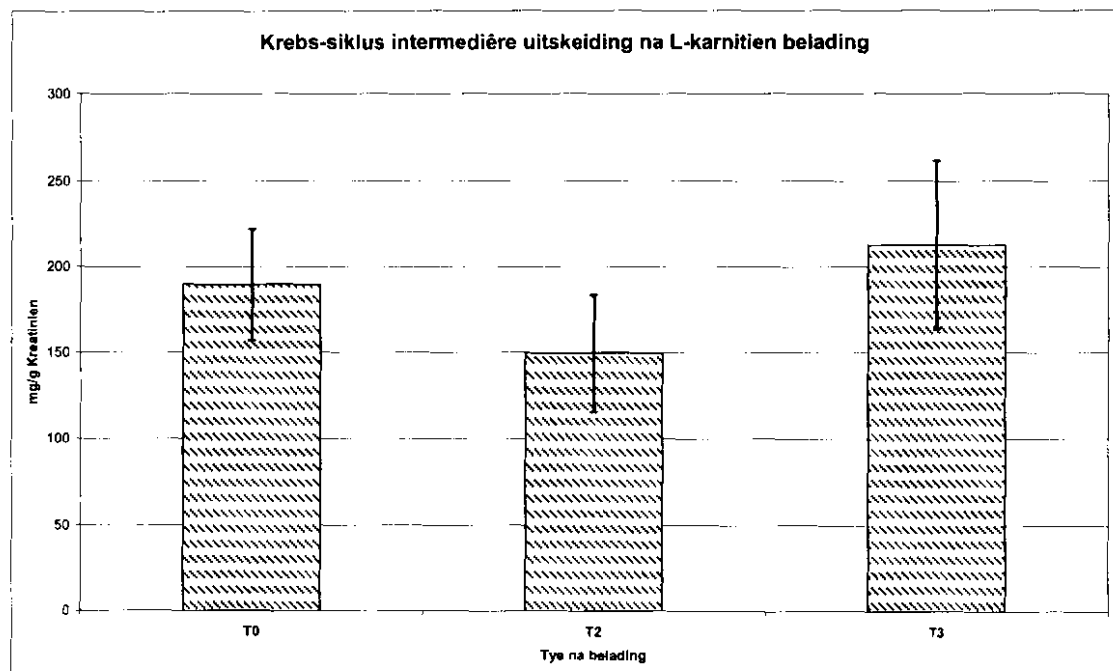
L-karnitien (1g/kg liggaamsmassa) het 'n stimulerende effek op die sitochroom p450 reduktasesisteem (omega oksidasie) in die teenwoordigheid van toksiese xenobiotika in selkulture, maar die effek is eers na 72 uur waargeneem (Czech *et al.*, 2006). Indien die sitosolkonsentrasies van asiel-KoA hoog genoeg styg sodat die asiel-KoA toksisiteit begin toon, kan daar 'n soortgelyke sisteem *iv vivo* vir die mens bestaan.

Die proefpersone het nie tydens die beladingeksperiment gevas nie. Die dieet van die proefpersone (bylaag D) het bloedglukose vlakke redelik konstant gehou, sodat die brein geen of min 3-OH-bottersuur nodig gehad het. Hieruit kan volg dat daar slegs genoegsame asetiel-KoA gebruik word vir ketogenese om te voorsien in die aanvraag daarvan, indien daar 'n aanvraag is. Asetiel-KoA Karboksilase sal dan 'n gedeelte van die asetiel-KoA omskakel na maloniel-KoA en vetsuursintese bevorder (Dunlop, 1986; Mitchell, 1978). Maloniel-KoA het 'n inhiberende effek op die karnitienpalmitoïeltransferase I (CPT I) (Cook *et al.*, 1983). As CPT I geïnhibeer word, kan langketting vetsure nie oor die mitochondriale buitemembraan getransporeer word nie. Maloniel-KoA is ook die eerste stap van vetsuurbiosintese.

Die moontlike stimulerende effek van L-karnitien op ketogenese en sitochroom p450 reduktase, suggereer dat L-karnitien se rol moontlik nie net beperk is tot langketting vetsuurtransport en fase II detoksifisering nie. Die lae dosis L-karnitien wat toegedien is, kan die toename in ketone verklaar en moontlik ook op verbeterde sitochroom p450 funksie dui. Dit bly egter spekulasie aangesien die literatuur geen direkte verband kan aantoon nie.

L-karnitien kan optree as 'n buffer vir asetielgroepe om sodoende te help om die energiebalans te herstel as vetsuuroksidasie te veel asetiel-KoA lewer (Shafi, 1998). L-karnitien kan dus die verhouding van [asetiel-KoA]/[[KoA] laat verander volgens die liggaam se energiebehoefte. Hoë asetiel-KoA en NADH konsentrasies mag dalk nie vetsuuroksidasie direk beïnvloed nie, maar inhibeer wel die piruvaatdehidrogenase kompleks omkeerbaar (Strumilo, 2005).

5.1.2.2 Krebs-siklus intermediêre



Figuur 17 : Krebs-siklus intermediêre (Tabel 1, Hoofstuk 3) uitgeskei in die uriene na L-karnitienbelading. T0, T2 en T3 stel onderskeidelik geen karnitienbelading (T0), 24 uur na karnitienbelading (T2) en na 7 dae van karnitien (T3) belading voor. Belading het nie 'n betekenisvolle verandering in uitskeiding veroorsaak nie ($p_B > 0.05$). Waardes gegee as gemiddelde en 95% VI, $n = 25$.

Die uitskeiding van Krebs-siklus intermediêre in die uriene verlaag gering 24 uur ná karnitienbelading en styg dan aansienlik ná die kroniese belading van 7 dae.

L-karnitien belading het egter nie statisties betekenisvolle verandering teweeg gebring nie.

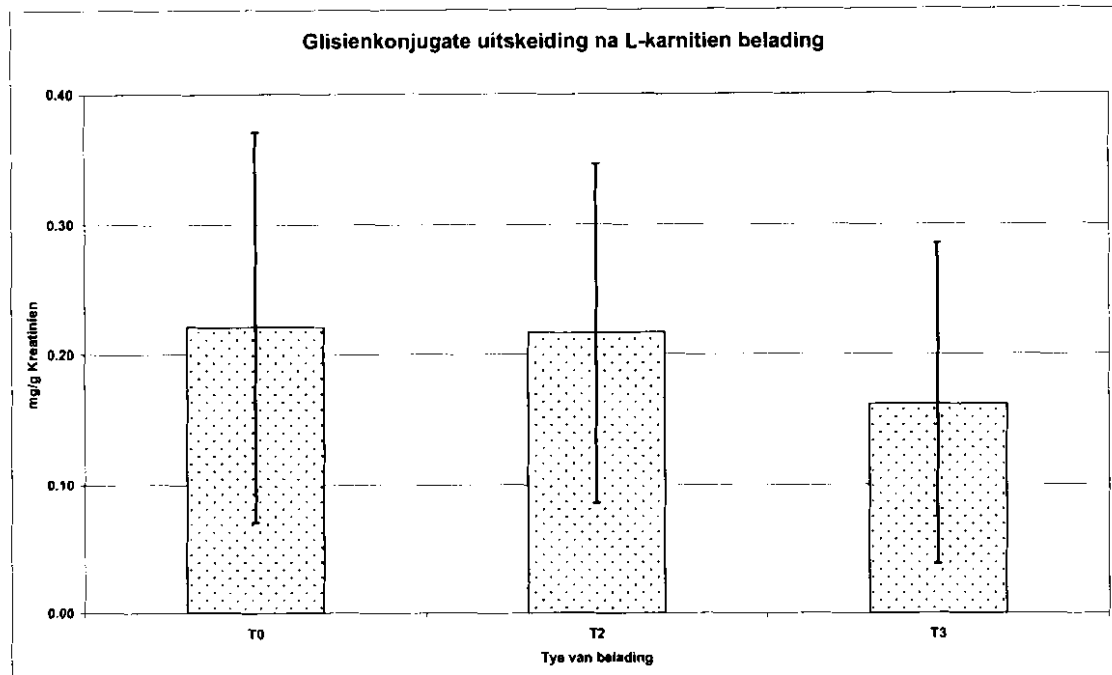
Die aanvanklike daling in Krebs siklus intermediêre, alhoewel nie betekenisvol nie, kan moontlik wees as gevolg van verhoogde Krebs siklus aktiwiteit. L-karnitien word deur 'n aktiewe (farmakologiese toediening) sowel as passiewe (dieet) meganisme deur die maagwand geabsorbeer, afhangende van wat die bron van die karnitien is (Gudjonssen *et al.*, 1992). Die presiese meganisme waarvolgens aktiewe absorpsie plaasvind, is onbekend. Die proses kan heel moontlik gebruik maak van NADH of ATP.

Die moontlikheid bestaan dat die verskynsel met die Krebs siklus metaboliete die gevolg is van die bufferkapasiteit wat L-karnitien uitoefen op die asetiel-KoA konsentrasies (soos genoem in 5.2.1) en sodoende die Krebs siklus reguleer. Die ander moontlikheid is dat die asetiel-KoA konsentrasies te hoog was met die aanvanklike L-karnitien wat die weefsel bereik het. Dit kon die piruvaatdehidrogenase kompleks inhibeer en so die Krebs siklus vertraag. Die intermediêre se konsentrasies sal gevolglik daal.

Die styging in die metaboliete by T3 is dalk 'n aanduiding dat L-karnitien die energiebalans herstel het en dat asetiel-KoA nie meer die piruvaatdehidrogenase kompleks inhibeer nie.

5.1.2.3 Glisienkonjugate

Geen tendens in verandering in die konsentrasie van glisienkonjugate is waargeneem vir die verskillende tye nie en gevolglik was daar geen statisties betekenisvolle verskille nie. Dit is moontlik dat die L-karnitien konjugering die intrasellulêre poel van ko-ensiem A tot so 'n mate uitgeput het dat glisienkonjugasie nie kon plaas-



Figuur 18 : Glisienkonjugate uitgeskei in die uriene na L-karnitienbelading. T0, T2 en T3 stel onderskeidelik geen karnitienbelading (T0), 24 uur na karnitienbelading (T2) en na 7 dae van karnitien (T3) belading voor. Belading het nie 'n betekenisvolle verandering in uitskeiding veroorsaak nie. Waardes gegee as gemiddeldes en 95% VI, n = 25.

vind nie. Dit is so omdat glisienkonjugasie afhanklik is van die hoeveelheid KoA en glisien wat beskikbaar is (Acara *et al.*, 1998).

Tydens die organiese suur analyses is daar ook by minder as die helfte van die proefpersone glisienkonjugate gevind. As die Km waardes van glisien-N-asieltransferase en karnitienasieltransferase vir spesifieke asiel-KoA verbindings vergelyk word, is dit duidelik dat karnitien asieltransferase die beter konjureringsstelsel is. Daar moet in gedagte gehou word, dat hoe laer die Km waarde vir 'n betrokke substraat is, hoe hoër is die affiniteit van die ensiem vir die betrokke substraat.

Vir oktanoïel-KoA as substraat is die Km waardes 198mM en 0.0503mM (<http://www.brenda.uni-koeln.de>) vir glisien-N-asieltransferase en karnitien asieltransferase onderskeidelik. Oktanoïelkarnitien is 'n biomerker vir MCADD.

Derhalwe bestaan die potensiaal om hoër konsentrasies van die karnitienkonjugate vir vetsuuroksidasie in die uriene te kry, behalwe as daar 'n vrye karnitientekort bestaan.

5.2 Gevolgtrekking

Die L-karnitienbelading het geen noemenswaardige verskil veroorsaak in enige metaboliete wat tydens analyses opgespoor is nie, behalwe vir die asielkarnitiene en vrye karnitien.

Vanuit die resultate kan die gevolgtrekking gemaak word dat L-karnitienbelading vir metabolies normaal persone nie 'n merkwaardige verskil sal meebring in die totale energiemetabolisme nie. Daar was wel 'n toename in totale asielkarnitiene, maar geen verandering in die totale energiemetabolisme isweerspieël nie. Met die metabolomika gebaseerde benadering wat gebruik is, is dieselfde resultaat verkry vir L-karnitienbelading as vir ander benaderingswyses in die literatuur.

L-karnitien suplementering vir metabolies normale persone is 'n kontroversiële onderwerp met geen duidelike eindpunte nie, maar in die studie toon die resultate dat lae dosisse L-karnitien (gekoppel met kroniese toediening) slegs 'n effek op die karnitien- en asielkarnitien metabolisme gehad het.

HOOFSTUK 6

RESULTATE EN BESPREKING VAN HOMOSIGOTE EN HETEROSIGOTE VAN MITOCHONDRIALE β -OKSIDASIE DEFEKTE

6.1 Kliniese beelde verkry van pasiënte

Daar is twee gesinne geïdentifiseer vanuit die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte (Skool vir Biochemie, Potchefstroom Kampus van die Noordwes-Universiteit) se databasis. Die eerste gesin is geïdentifiseer vir Glutaarsuururie Tipe II en die tweede gesin vir Medium Ketting Asiel-KoA-dehidrogenase defek. In die volgende paar paragrawe sal die besonderhede van elke gesin bespreek word.

Die gesinne se data sal gebruik word om die liniêre sommering metabolomika gebaseerde benadering te toets en te kyk of heterosigote wel in die uriene opgespoor kan word met behulp van eenvoudige siftingsanalises (GC-MS en LC-MSMS).

6.1.1 Glutaarsuururie Tipe II (Meervoudige Asiel-KoA-dehidrogenase defek)

Urienmonsters is verkry vanaf 'n gesin waar Glutaarsuururie Tipe II bevestig is. Ensiemanalises het bevestig dat die ouers heterosigoties en die kinders homosigoties is. Albei kinders het simptome getoon van herhalende brakingsaanvalle, ketose en het geweier om te eet. Tydens die diagnose van die kinders was die vader en moeder a-simptomaties.

Die moeder het eers onlangs (begin 2005) simptome begin toon, ondanks die feit dat die kinders 'n geruime tyd gelede reeds gediagnoseer is. Spierswakheid en letargie was van die algemene simptome wat voorgekom het by die moeder tydens episodes. Die moeder en haar kinders ontvang L-karnitiese suplementering asook 'n hoë koolhidraat, lae vet en lae proteïedieet as behandeling.

6.1.2 Mediumketting-asiel-KoA-dehidrogenase Defek (MCADD)

In hierdie gesin was daar alreeds 4 sterftes gewees weens MCADD. Onlangs het 'n vyfde kind simptome getoon, maar het die episode oorleef. Die vierde en vyfde kinders se uriene is verkry sowel as die ouers se uriene. Die vierde kind is uitgesluit vir die eerste deel van die studie, maar word by die tweede deel ingesluit. Ensiemanalises het bevestig dat beide ouers heterosigoties is en die kind homosigoties vir MCADD.

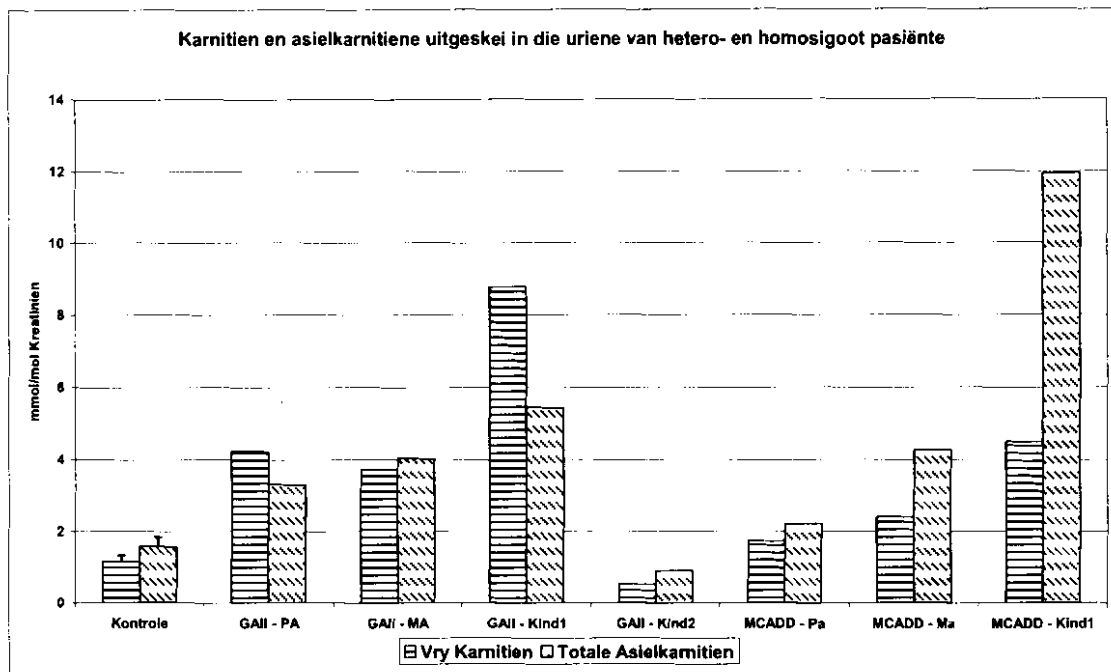
Geen kliniese inligting van die gesin kan verkry word nie. Die enigste inligting wat bekend is, is dat die oorlewende kind op L-karnitiese behandeling geplaas is met 'n hoë koolhidraat en lae vet dieet.

6.2 Resultate en bespreking: Liniêre sommering vir heterosigote en homosigote van aangebore defekte van vetsuurkatabolisme

Alle numeriese waardes vir die grafieke sal in tabelvorm weergegee word in Bylaag C, Tabel 6 (Tabelle van numeriese waardes vir resultaatgrafieke). Verwys na Tabel 1, Hoofstuk 3 vir alle beredenering en aanduidings van metaboliete in elke groep ingesluit.

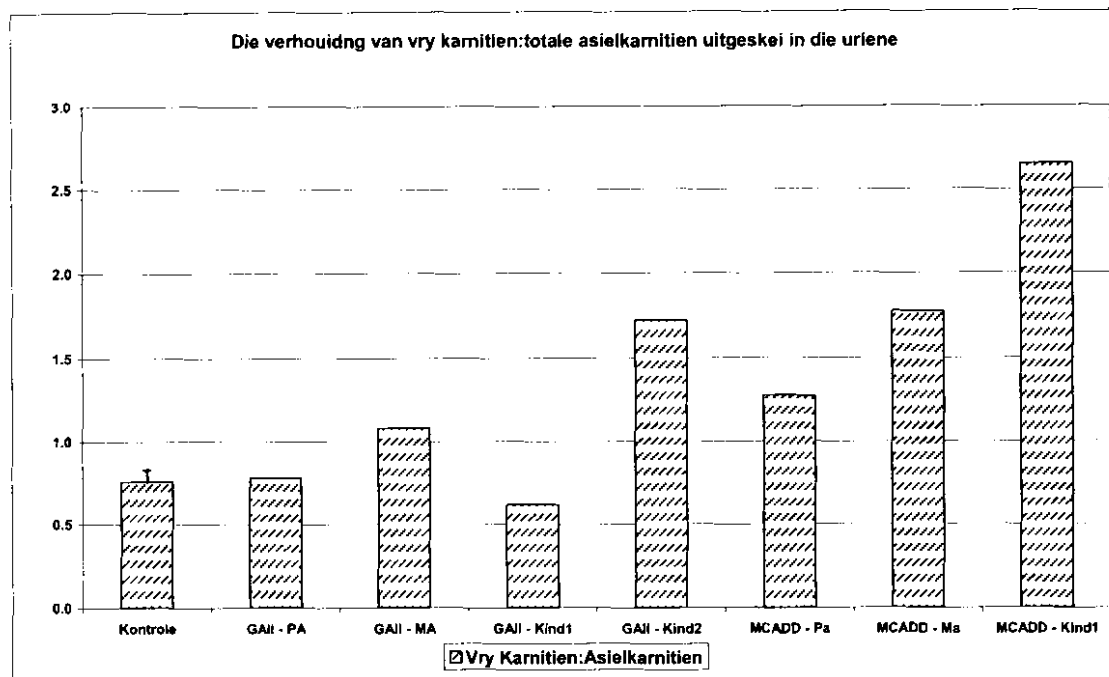
Die benadering wat gebruik word om die resultate weer te gee in die hoofstuk, kan verkry word in Hoofstuk 3 (3.1 & 3.2). Die kontrolewaarde is die T0 waarde van Hoofstuk 5 met die 95% vertrouensinterval.

6.2.1 Karnitiene en asielkarnitiene



Figuur 19 : Karnitiene en asielkarnitiene van hetero en homosigotiese pasiënte wat ly aan aangebore defekte van β -oksidase. GAI – Glutaricaciduria Type II; MCADD – Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Die Kontrolle is die waarde wat ooreenstem met T0 vir metaboliet groeperings in Hoofstuk 5 met 95% vertrouensintervalle. Waardes kan in Tabel 6, Bylaag C verkry word. Die praktiese effek $d \geq 0.5$ (Tabel 12, Bylaag C).

'n Verhoging in vrye karnitien en asielkarnitien (uitgeskei in die uriene) het by al die pasiënte voorgekom, behalwe GAI-Kind2 (figuur 19). Verder was die verhouding van vrye karnitien:totale asielkarnitien verhoog teenoor die kontrole behalwe vir GAI – Pa en GAI – Kind1 (figuur 20). In alle gevalle het die praktiese effek 'n aansienlike tot baie groot verskil getoon vir alle metaboliete ten opsigte van die kontrolewaarde (tabel 12, Bylaag C).



Figuur 20 : Die verhouding van vrye karnities:totale asielkarnities uitgeskei in die uriene vir heterosigotiese en homosigotiese pasiënte wat ly aan aangebore defekte van β -oksidasie. GAI – Glutaric aciduria Type II; MCADD – Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Die Kontrole is die waarde wat ooreenstem met T0 vir metaboliet groeperings in Hoofstuk 5 met 95% vertrouensintervalle. Waardes kan in Tabel 6, Bylaag C verkry word. Die praktiese effek $d \geq 0.5$ vir alle metaboliete behalwe GAI - Pa (Tabel 12, Bylaag C).

Die urienmonsters wat ontvang is, was geneem tydens a-simptomatiesse episodes in die geval van die homosigote en GAI – Ma (heterosigoot). Die homosigotiese pasiënte was dus alreeds op behandeling gewees vir die betrokke defekte, wat L-karnities supplementering insluit. Die L-karnities supplementering kon 'n moontlike effek gehad het op die vrye karnities wat in die uriene uitgeskei is en kan die resultate beïnvloed.

Gevolgtik kan die aanname gemaak word dat die verhoogde konsentrasies vrye karnities (figuur 19) kan wees as gevolg van behandeling ontvang voor uriene gekollekteer is of moontlik weens verhoogde *in vivo* karnitiesintese waar die metabolisme probeer kompenseer vir verhoogde detoksifiseringdoeleindes. Die dosisse L-karnities supplementering wat die pasiënte ontvang het, is onbekend.

Derhalwe kan geen uitspraak gemaak word oor die effektiwiteit van die dosis L-karnities aan die pasiënte toegedien nie. Verder kan daar geen gevolgtrekking gemaak word wat die invloed van die L-karnities suplementering was op die konsentrasie van vrye karnities in die uriene uitgeskei nie.

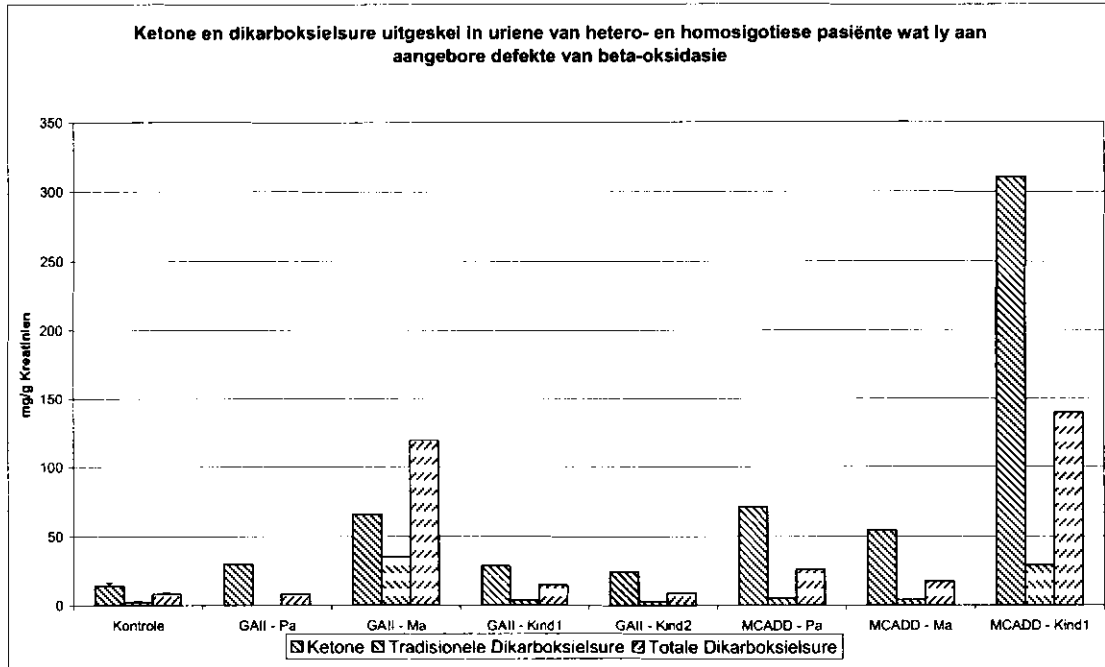
Die verhoging van asielkarnitiene (figuur 19) is toe te skryf aan 'n defekte β -oksidase ensiem of verwante kataboliese ensiem (bv. vertakte ketting aminosuorkatabolisme). 'n Defekte ensiem in vetsuur- en verwante katabolismes sal lei tot 'n opeenhoping van asiel-KoA in die mitochondriale matriks sowel as die sitosol en deur L-karnities suplementering word fase II, naamlik detoksifisering en asielkarnities konjugering bevorder (Blaskovics *et al.*, 2005).

As daar gekyk word na Figuur 19, kan gesien word dat GAll – Kind2 (homosigoties vir Glutaarsuururie Tipe II) se vrye karnities en asielkarnities konsentrasies normaal vertoon, maar vanuit Figuur 20 kan duidelik gesien word dat die verhouding van vrye karnities:asielkarnities (1.724:1) verhoog is teenoor die kontrole (0.761 ± 0.070). GAll. Kind1 vertoon volgens die verhouding (figuur 20) normaal (0.620), maar 'n moontlike verklaring kan wees dat die L-karnities behandeling baie suksesvol is in die pasiënte se geval.

Die heterosigotiese pasiënte vertoon almal 'n verhoging bo normaal vir die vrye karnities:totale asielkarnities verhouding (figuur 20) behalwe GAll – Pa. GAll – Pa was onder geen behandeling nie, maar is 'n bevestigde heterosigoot vir Glutaarsuururie Tipe II.

Daar moet in ag geneem word dat uriene wat vanaf mediese instansies ontvang word, nie onder ideale laboratoriumtoestande versamel kan word nie. Uriene word gewoonlik versamel tydens a-simptomatiese episodes of na behandeling reeds toegedien is. 'n Pasiënt se lewe kan nie in gevaar gestel word om die ideale navorsingsurienmonster te verkry nie.

6.2.2 Ketone en dikarboksielsure



Figuur 21: Ketone en dikarboksielsure (Tabel 1, Hoofstuk 3) uitgeskei in die uriene van hetero- en homosigotiese pasiënte wat lei aan aangebore defekte van β -oksidasie. GAll – Glutaric aciduria Type II; MCADD –Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Die Kontrole is die waarde van ooreenstemmende van T0 vir metaboliet groeperings in Hoofstuk 5 met 95% vertrouens intervale. Waardes kan in Tabel 6, Bylaag C verkry word. Die praktiese effek is $d \geq 0.5$ vir alle pasiënte en metaboliete behalwe GAll – Pa en GAll Kind2 by Totale Dikarboksielsure (Tabel 13, Bylaag C).

Ketoonliggaampies was verhoog gewees (figuur 21) vir alle groepe ten opsigte van die kontrole. In die geval van die homosigotiese pasiënte (GAll – Ma ingesluit) is dit verstaanbaar en word in die literatuur beskryf (Blaskovics *et al.*, 2005; Matern *et al.*, 2005; OMIM, 2005). Verder toon die praktiese effek 'n beduidende verskil aan vir alle pasiënte behalwe GAll – Pa ($d = 0.01$) en GAll – Kind2 ($d = 0.18$).

Enige defek wat die katabolisme van verbindings beïnvloed, wat gebruik kan word vir asetiel-KoA produksie, sal 'n versteuring in energiemetabolisme veroorsaak. Die ATP:ADP; NADH:NAD en asetiel-KoA:KoA verhoudings sal

verskuif om soedoende te kompenseer deur meer asetiel-KoA te lewer vir ketoonsintese (Dunlop *et al.*, 1986).

Wat verder ingedagte gehou moet word, is dat individuele dieet 'n groot invloed het op ketoonsintese. Die homosigotiese pasiënte (GAI – Ma ingesluit) was, soos alreeds genoem, reeds op behandeling en het heel moontlik 'n aangepaste dieet ingesluit soos in die literatuur voorgeskryf word. Die voorgeskrewe dieet vir beide defekte onder bespreking, is 'n lae vet en hoë koolhidraat dieet vir die handhawing van hoë glukosevlakke sowel as genoegsame ketoonsintese (Blaskovics *et al.*, 2005).

L-karnitien suplementering in lae dosisse kan ketoonsintese bevorder (Akçetin *et al.*, 1987; Mitchell, 1987), maar dit is nie bekend wat die dosis L-karnitien was wat verskaf is aan die homosigotiese pasiënte nie (GAI – Ma ingesluit). Gevolglik kan geen kommentaar gelewer word met betrekking tot die effek wat die L-karnitien behandeling op ketoonsintese gehad het nie.

Die heterosigotiese pasiënte, GAI – Ma uitgesluit, het verder ook 'n toename in ketoonkonsentrasies getoon (figuur 21), maar dit is onduidelik of dit die oorsaak is van 'n versteuring in die energiemetabolisme as gevolg van 'n milde ensiemdefek in vetsuurkatabolisme en of dit weens 'n moontlike ketogeniese dieet kan wees.

Daar moet in gedagte gehou word dat ketone nie net afkomstig kan wees vanaf vetsuurkatabolisme nie, maar ook van alternatiewe weë waar ketogeniese aminosure voorkom. Aangesien aminosure nie ingesluit is in hierdie studie nie, is dit onduidelik hoe groot die rol was wat die groep verbindings gespeel het op ketoonsintese. Die moontlikheid bestaan dat die liggaam proteienkatabolisme sal bevorder tydens versteurde energiemetabolisme om asetiel-KoA en propioniel-KoA te vorm vanaf die degradasie van aminosure. Indien dit die geval was, sou ketoonsintese gestimuleer word deur die toename in asetiel-KoA.

Die dikarboksielsure (tradisioneel) en verwante derivate (totale dikarboksielsure) het nie 'n aansienlike toename getoon vir die verskillende pasiënte nie. Geen beduidende verskil is waargeneem tussen die heterosigote en homosigote nie behalwe vir GAI1 – Ma (heterosigoot), MCADD – Pa (heterosigoot) en MCADD-Kind1 (homosigoot) soos gesien kan word vanuit Figuur 21.

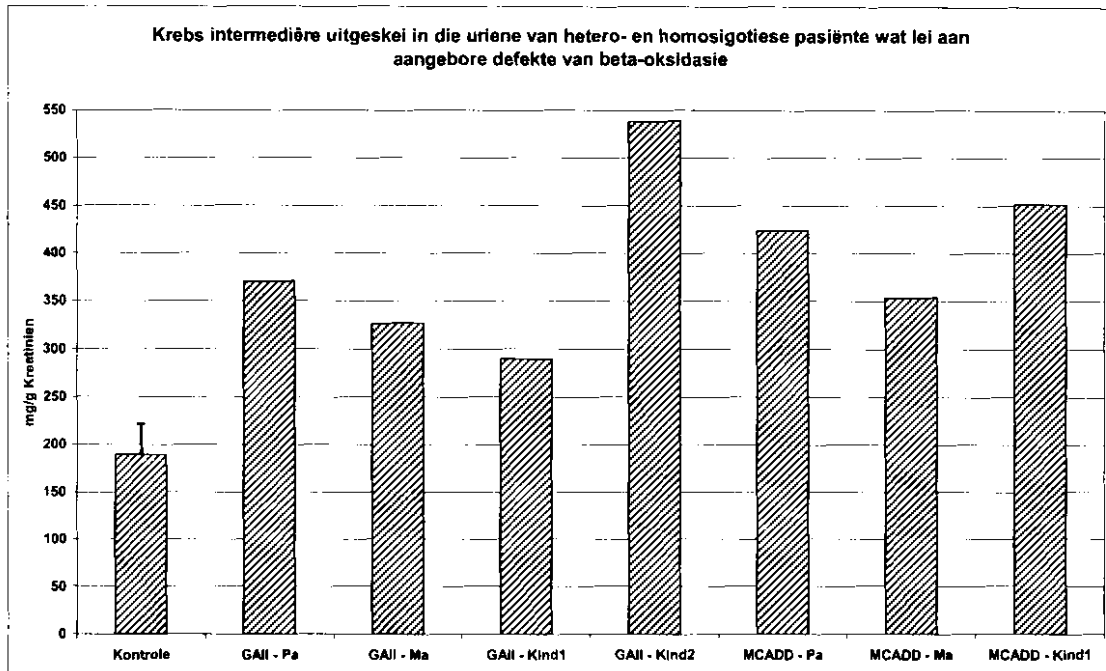
In die geval van die homosigotiese pasiënt (MCADD – Kind1) kan verhoogde dikarboksielsure verwag word (Blaskovics *et al.*, 2005; Matern *et al.*, 2005) wat geassosieer word met die betrokke defek. Met die heterosigotiese pasiënte (GAI1 – Ma en MCADD – PA) kan dit moontlik wees dat, alhoewel die ensiemdefek 'n milder vorm van die defek is, kan dit moontlik nog steeds die biomerker metaboliete vorm wat kenmerkend aan die defek is.

Daar was in die bg. gevalle 'n meer beduidende toename in totale dikarboksielsure as die tradisionele dikarboksielsure. By die totale dikarboksielsure groepering (tabel 1, Hoofstuk 3) is daar dikarboksielsuurderivate ingesluit wat afkomstig is vanaf verskillende aminosuorkatabolismes. Dit kan daarop dui dat die aminosuorkatabolismes in gedagte gehou moet word vir toekomstige studies. Vanuit die resultate blyk dit dat die aminosure moontlik 'n groter invloed kan hê as wat verwag was.

6.2.3 Krebs siklus Intermediêre

'n Aansienlike toename in krebssiklus intermediêre is waargeneem vir hetero- en homosigote ten opsigte van die kontrolegroep (figuur 22) en word bevestig deur die praktiese effek wat verhoog was vir alle pasiënte ($d \geq 0.8$, Tabel 13 Bylaag C).

Die Krebs siklus is amfibolies en indien die verhoudings van ATP:ADP, NADH:NAD en asetiel-KoA:KoA konsentrasies na die regterkant van elke ver-



Figuur 22: Krebsiklus Intermediêre (Tabel 1, Hoofstuk 3) uitgeskei in die uriene van hetero- en homosigotiese pasiënte wat lei aan aangebore defekte van β -oksidasie. GAI – Glutaric aciduria Type II; MCADD – Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Die Kontrole is die waarde van ooreenstemmende van T0 vir metaboliet groeperings in Hoofstuk 5 met 95% vertrouensintervalle. Waardes kan in Tabel 6, Bylaag C verkry word. Die praktiese effek was aansienlik verhoog vir alle pasiënte ($d \geq 0.8$, Tabel 13 Bylaag C).

houding skuif, sal die Krebsiklus asetiel-KoA produseer. Indien dit nodig is, kan van die aminosure omgeskakel word na die verskillende Krebsiklus intermediêre.

Die homosigotiese pasiënte (GAI – Ma ingesluit) was op 'n lae vet – hoë koolhidraat dieet. Verhoogde koolhidraatname bevorder die glikoliseweg en gevolglik sal die Krebsiklus ook bevorder word. Die homosigotiese pasiënte sal heel waarskynlik verlaagde NADH:NAD, ATP:ADP en asetiel-KoA:KoA verhouding hê, met ander woorde energieproduksie word gepromoveer.

Dit is verder ook moontlik dat die L-karnitien behandeling voorkom het dat daar nie asetiel-KoA ophoop nie en sodoende verder voorkom het dat daar nie inhibisie van die piruvaatdehidrogenase kompleks plaasgevind het nie (Strumilo,

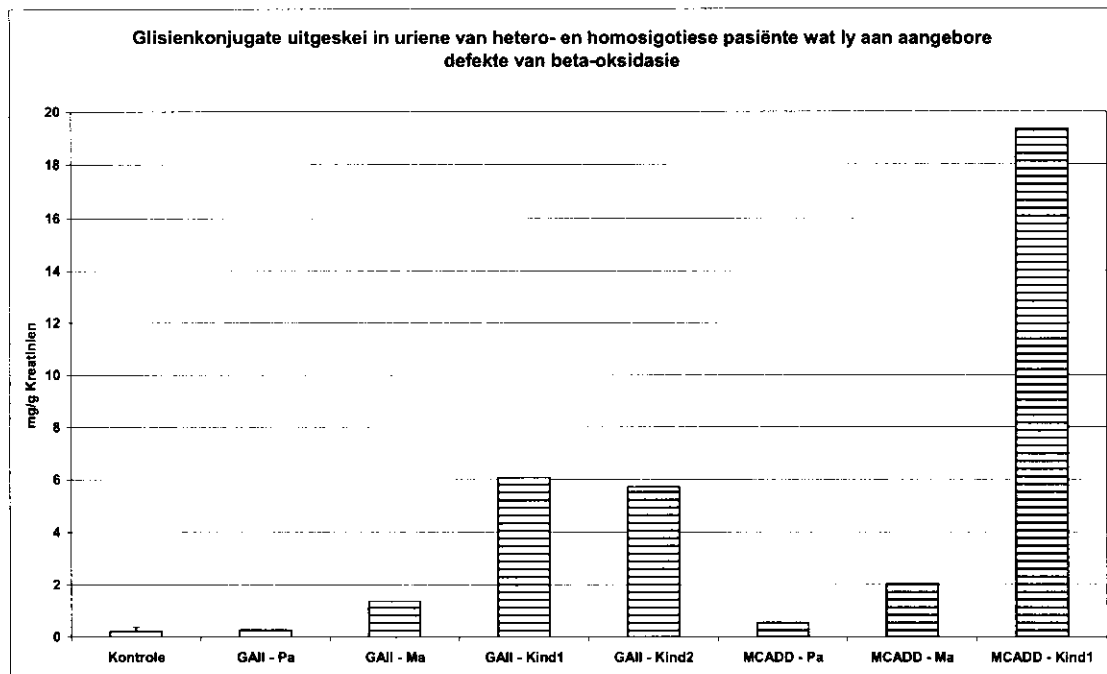
2005; Shafi, 1998). In die geval van die Krebs siklus, as die lg. aannames korrek is, sal die Krebs siklus intermediêre styg om ongestoord asetiel-KoA te lewer vir energiebehoefes van die liggaam.

Dit is onbekend of die heterosigotiese pasiënte (GAll – Ma uitgesluit) dieselfde dieet gevolg het as hulle homosigoties familieledes. Die moontlikheid bestaan dat die hele gesin 'n aangepaste dieet sal volg. Indien dit wel die geval is, kan dieselfde verklaring verskaf word as in die vorige paragraaf. 'n Ander moontlike verklaring kan wees dat aangesien die heterosigotiese pasiënte se energiemetabolisme nie in dieselfde graad geaffekteer is soos die homosigotiese pasiënte nie, kan daar waarskynlik beter kompensasie plaasvind in die metabolisme deurdat vetsuuroksidasie genoegsaam asetiel-KoA lewer. Die lg. opmerking (gekoppel aan 'n alledaagse dieet) sal dan genoeg energie verskaf.

6.2.4 Glisienkonjugate

Daar is verhoogde glisienkonjugate gevind in die urine van al die pasiënte (figuur 23) ten opsigte van die kontrole behalwe GAll-Pa en MCADD-Pa (beide heterosigote). MCADD-Pa het wel volgens die praktiese effek ($d = 0.86$) 'n aansienlike verskil getoon ten opsigte van die kontrole. GAll-Pa ($d = 0.13$) het nie 'n verskil getoon volgens die praktiese effek nie. GAll – Ma ($d = 2.97$) en MCADD – Ma (4.72), beide heterosigote, het wel 'n aansienlike verhoging in glisienkonjugaatkonsentrasies getoon. Soos verwag, het al die homosigote verhoogde glisienkonjugaatkonsentrasies gehad.

Glisienkonjugering is 'n alternatiewe weg as die karnitienkonjugeringsweg onder hoë druk geplaas word en as die beskikbare L-karnitien uitgeput word. Die laaste stelling word gestaaf deurdat die Km waardes van asetiel-KoA's vir



Figuur 23 : Glisienkonjugate (Tabel 1, Hoofstuk 3) uitgeskei in die uriene van hetero- en homosigotiese pasiënte wat lei aan aangebore defekte van β -oksidasie. GAI – Glutaric aciduria Type II; MCADD – Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Die Kontrole is die waarde van ooreenstemmende van T0 vir metaboliet groeperings in Hoofstuk 5 met 95% vertrouensintervalle. Waardes kan in Tabel 6, Bylaag C verkry word. Die praktiese effek het 'n aansienlike verskil getoon vir alle pasiënte ten opsigte van kontrolewaardes behalwe vir GAI – Pa ($d \leq 0.2$). Die praktiese effek vir die pasiënte word weergegee in Tabel 13, Bylaag C.

Karnitien-Asieltransferase laer vertoon as vir Glisien-Asilase (Hoofstuk 5, 5.2.3). Indien die glisienkonjugate onder bespreking (Tabel 1, Hoofstuk 3) toeneem in konsentrasie, kan daar die aanname gemaak word dat die karnitienkonjugeringsstelsel onder druk geplaas word.

Vanuit die literatuur word dit verwag dat homosigote 'n toename in glisienkonjugate sal toon (Hoofstuk 2, 2.7.1). Die heterosigote het ook 'n toename getoon in glisienkonjugate. 'n Moontlike verklaring vir die verskynsel by die heterosigote kan verkry word deur te redeneer dat indien hulle 'n hoë vetiname gehad het voor die neem van die urienmonster, sou die gereduseerde ensiemaktiwiteit nie vetsuurkatabolisme vinnig genoeg kan laat plaasvind nie.

Geen L-karnitien is verskaf aan die heterosigote nie (Gall – Ma uitgesluit) en die liggaam kon moontlik nie genoegsame L-karnitien *in vivo* sintetiseer vir die Karnitien-Asieltransferase detoksifisering nie.

Indien die aanames in die vorige paragraaf korrek is, sal die glisienkonjugeringsweg in gebruik geneem word by die heterosigote, maar in 'n geringer mate as vir homosigote. Heterosigote behou nog steeds genoegsame ensiemaktiwiteit vir metaboliese kompensasië; derhalwe kan dit moontlik wees dat die verbeterde metaboliese kompensasië weerspieël sal word in die alternatiewe- of detoksifiseringsweë.

6.3 Samevattende bespreking: Liniêre sommering vir heterosigote- en homosigote van aangebore defekte van vetsuurkatabolisme

'n Defek in mitochondriale β -oksidasië sal veroorsaak dat biomerkers, wat uniek is vir 'n betrokke ensiem van die weg, in aansienlike konsentrasies in die uriene uitgeskei word (Blaskovics *et al.*, 2005; Matern *et al.*, 2005). Asielkarnitiene (figuur 19), dikarboksiësure (figuur 21) en ketone (figuur 21) is die mees algemene biomerkers (Blaskovics *et al.*, 2005; Matern *et al.*, 2005).

Die invloed van die betrokke defekte op die Krebs siklus (figuur 22) kan duidelik waargeneem word. As geen asetiel-KoA vanaf β -oksidasië aan die Krebs siklus verskaf word nie, sal alternatiewe weë gebruik word, bv. ketogeniese en glukogeniese aminosure. Die alternatiewe weë poog om die metaboliese wanbalans te herstel na normaal, sodat voldoende energie gelewer kan word aan die verskeie stelsels.

Die resultate toon 'n hoë heterogeniteit met betrekking tot metabolietgroeperingskonsentrasies vir dieselfde defek. Die mate van heterogeniteit in metabolietkonsentrasies is moontlik die weerspieëling van ko-

ekspressie, negatief of positief, op geenvlak (Hoofstuk 2, 2.3.3.2). 'n Defek vroeg in 'n metaboliese weg, kan lei tot die onderekspressie van ensieme wat later in die weg betrokke is en selfs die oorekspressie van ensieme wat in 'n voorloper metaboliese weg teenwoordig is (Cravatt *et al.*, 2005a; Cravatt *et al.*, 2005b; Church *et al.*, 2005).

Die styging van Krebs siklus intermediêre (f22) wat by die homosigote en heterosigote waargeneem is, is 'n goeie aanduiding van hoe globaal die invloed van 'n versteuring in die vetsuurkatabolisme is en hoe die totale energiemetabolisme beïnvloed word. Vanuit die resultate blyk dit dat 'n ernstige- (homosigotiese) sowel as 'n milde (heterosigotiese) defek in energiemetabolisme weerspieël word.

Die geheelbeeld benadering het 'n merkbare verskil verkry in konsentrasietoenames vir die oorgrote meerderheid van metabolietgroeperings. Die globale konsentrasies van organiese sure (figuur 21, 22 en 23) toon 'n aansienlike verskil ten opsigte van kontrolewaardes vir homosigote sowel as heterosigote aan.

Sou die metaboliete individueel onder beskouing geplaas word, soos in die geval van konvensionele benaderingsdiagnoses, sal 'n geringe verskil tussen die metaboliete van 'n normale persoon en 'n heterosigoot voorkom. 'n Homosigoot sou 'n merkbare verskil getoon het ten opsigte van normaal.

Daar word dus afgelei dat selfs 'n geringe afname in ensiematiese aktiwiteit kwantitatief opgespoor kan word deur eenvoudige urienanalises te doen.

Die konvensionele uriene siftingsanalises wat op die GC-MS (organiese sure) en LC-MSMS (asielkarnitiene) gedoen word en opeenvolgende dataverwerking spoor slegs homosigotiese pasiënte op. Die metabolomika gebaseerde benadering wat ontwerp is, se hoofdoel was om te bepaal of heterosigote

opgespoor kon word in die uriene deur die konvensionele siftingsanalises. Die SOP (Standard Operating Procedure) vir die GC-MS en LC-MSMS is onveranderd gebruik. Slegs die daaropvolgende dataverwerking is vanuit 'n ander oogpunt benader, naamlik 'n metabolomika gebaseerde benadering (Hoofstuk 3, 3.1 & 3.2), wat die geheelbeeld van metaboliete betrokke by vetsuurkatabolisme in berekening bring.

Vanuit die verskillende figure vir die metabolietgroeperings het die heterosigotiese pasiënte sowel as die homosigotiese pasiënte aansienlike verhoging getoon in metabolietkonsentrasies ten opsigte van normaal. Die heterosigotiese metabolietkonsentrasies was wel minder verhoog as die homosigotiese s'n, maar die verhoging was genoegsaam om opspoorbaar te wees met die nuwe benadering.

Vanuit die literatuur word daar tans heterosigootsifting slegs vir geselekteerde defekte gedoen en dit word gedoen met molekulêre tegnieke nadat homosigote deur middel van uriene siftingsanalises opgespoor is, soos in die geval van sistiese fibrose (Inal *et al.*, 2000; Grody *et al.*, 2004). Tot op hede is daar geen vermelding in die literatuur opgespoor met betrekking tot siftingsanalises vir heterosigote van vetsuurkatabolisme defekte nie.

Vetsuurdefekte is 'n groep ernstige defekte wat verstandelike gestremdheid, orgaanversaking, asook die dood tot gevolg kan hê en kom gewoonlik by pasgeborenes voor. In uitsonderlike gevalle kan selfs volwassenes met simptome presenteer (Grice *et al.*, 2000; Andresen, 2003; Bros *et al.*, 2004; Blaskovics *et al.*, 2005). As voorbeeld van laasgenoemde geval het 'n moeder vroeg in 2005 simptome vertoon, wat kenmerkend vir 'n vetsuurkatabolisme defek is (Hoofstuk 6, 6.1.1).

Die konvensionele siftingsanalises kon geen konkrete bewys lewer vir die defek nie, anders as die kinders van dieselfde gesin nie. Ensiemanalises het bevestig

dat die moeder Glutaarsuururie Tipe II het, maar dat sy 'n heterosigoot is wat met die defek se simptome presenteer.

Met die nuwe metabolomika gebaseerde bandering het dit duidelik na vore gekom dat daar 'n probleem is vir die moeder op metaboliese vlak ((GAI – MA is die pasiënt (Figure 19 – 23)). Die ander heterosigote het wel nie gepresenteer met simptome nie, maar hulle metaboliete het aansienlik verskil van normaal.

Die groep vetsuurkatabolisme defekte kan 'n ernstige lewenskwaliteitverlaging tot gevolg hê. As vroegtydige deteksie van heterosigote kan plaasvind, kan toekomstige voorvalle wat soortgelyk is aan GAI – Ma doeltreffender opgespoor word en daar kan beter voorsorg getref word vir 'n moontlike homosigoot.

Indien heterosigotiese pasiënte opgespoor word, kan genetiese konsultasie verskaf word (Grody *et al.*, 2004). Vroegtydige behandeling kan dus plaasvind en derhalwe lewenskwaliteit verbeter (Inal *et al.*, 2000; Grody *et al.*, 2004).

Daar kan dus gesê word dat dit suksesvol was om heterosigote van aangebore defekte van vetsuurkatabolisme op te spoor in die uriene met konvensionele siftingsanalises, wel gekoppel aan die nuwe metabolomika gebaseerde benadering. Die benadering is nog nie spesifiek genoeg om 'n betrokke defek uniek uit te lig nie, maar dit het aangetoon dat dit wel moontlik is om 'n heterosigotiese pasiënt op te spoor. Toekomstige verfyning van die proses kan moontlik verbeterde diagnostiek met verhoogde spesifisiteit tot gevolg hê.

6.4 Resultate en bespreking: Asielkarnitien vergelykings vir heterosigote en homosigote wat aan aangebore defekte van vetsuurkatabolisme ly

Die grafieke in hierdie gedeelte is almal dimensieloos op die y-as as gevolg van die ontwerp van die asielkarnitienformules. Verder kan alle numeriese waardes

vir die grafieke (gemiddeldes, 95% vertrouensintervalle, n-waardes) in Bylaag C van nader bestudeer word (tabelle van numeriese waardes vir resultaat grafieke).

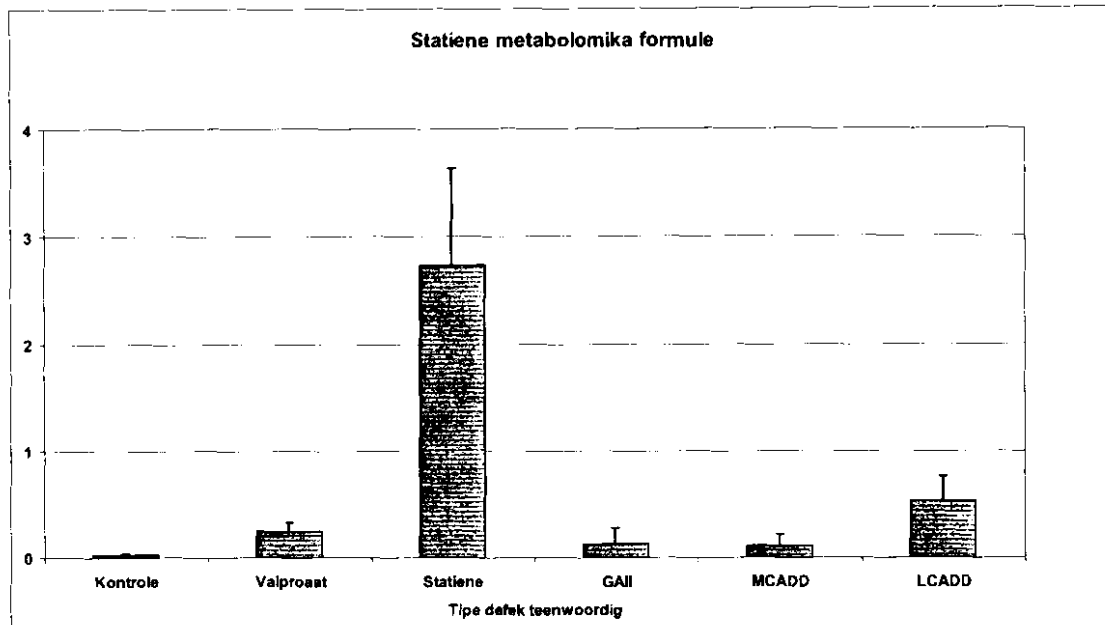
Die praktiese effek word gebruik om te onderskei tussen die kontroles en pasiënte en om te bepaal of daar 'n verskil is tussen die pasiënte en die kontroles van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte. Die praktiese effek waardes is in Bylaag C (Tabelle 14 en 15).

Die persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte is almal ná organiese suur en asielkarnitiese analyses as normaal gediagnoseer ten opsigte van aangebore defekte van metabolisme. Die data van die persone is in die gedeelte gebruik om te bepaal hoe effektief die ontwerpte metabolomika formules is ten opsigte van ouderdom en geslag. Verder word daar ook vergelyk hoe die verskillende ouderdomsgroepesgroepe en geslagte vergelyk met lyers van aangebore defekte van vetsuorkatabolisme.

Alle formules wat gebruik is, word volledig in Hoofstuk 3.3 bespreek.

6.4.1 Statien metabolomika formule

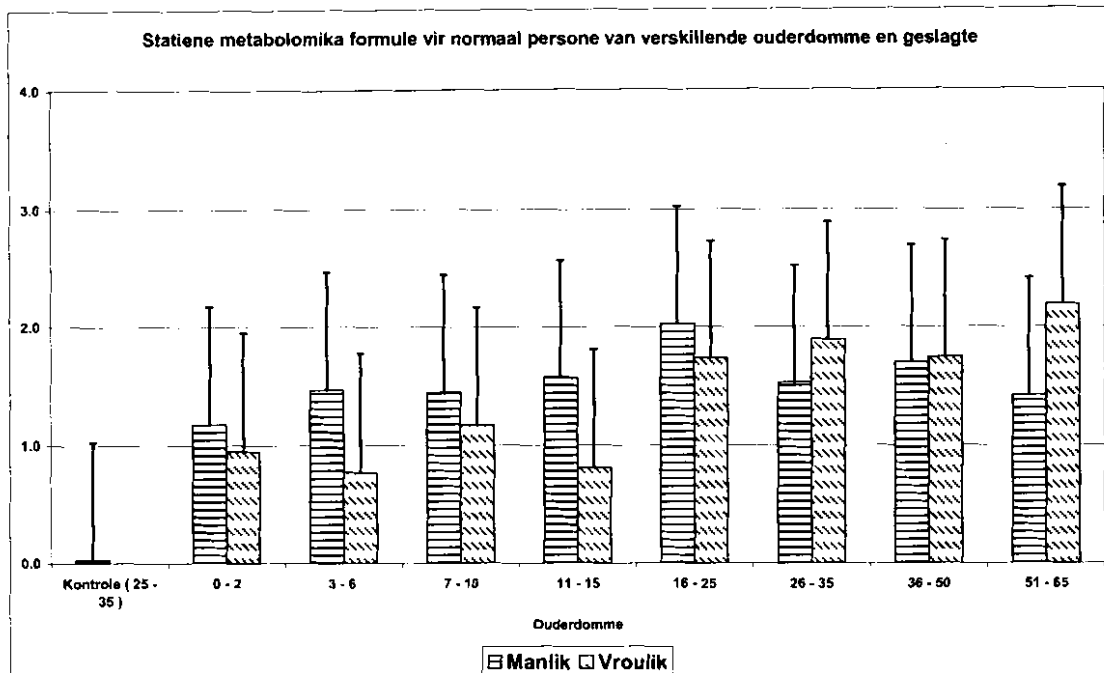
Die statienformule (Figuur 24) maak redelike goeie onderskeid tussen die verskillende aangebore defekte van vetsuorkatabolisme as die waardes met die 95% vertrouensinterval vergelyk word (Tabel 7, Bylaag C). Dit geld ook vir die praktiese effek ($d \geq 0.5$, Tabel 14 Bylaag C). Die onderskeid tussen kontroles van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte is nie baie goed (figuur 25) as net die 95% vertrouensinterval gebruik word nie. Die praktiese effek toon wel 'n beduidende verskil aan tussen die medikasiegebruikers en kontroles ($d \geq 0.8$, Tabel 15 Bylaag C). Kyk ook Tabel 7, Bylaag C en die statienewaardes in Tabel 8 (Bylaag C).



Figuur 24: Statiene metabolomika formule wat onderskei tussen die verskillende aangebore defekte van vetsuurkatabolisme. Valproaat en statiene is albei medikasies, GAI-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan in Tabel 7, Bylaag C verkry word. Die praktiese effek ($d \geq 0.5$) verskil aansienlik vir die pasiënte ten opsigte van die statienwaarde (Tabel 14, Bylaag C).

Propionielkarnitien, die karnitienkonjugaat van propioniel-KoA, is een van die metaboliete wat gebruik is in die ontwerp van die formule. Propioniel-KoA (Hoofstuk 3, 3.3.4) kan deur drie moontlike metaboliese weë geproduseer word: vertakte ketting aminosuurkatabolisme, onewe ketting vetsuurkatabolisme en cholesterolbiosintese.

Die kontrole (f24 & 25) was onder geen behandeling nie en het voor die begin van die studie ongekontroleerde diëte gevolg. Die tipiese dieet in Suid Afrika neig tot 'n hoë vetinname wat kan lei tot verhoogde vetsuuroksidasie en cholesterolbiosintese sodat meer asetiel-KoA en propioniel-KoA vorm.



Figuur 25: Statiemetabolomika formule vir normale persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte. Valproaat en statiene is albei medikasies, GAI-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan verkry word in Tabel 8, Bylaag C. Die praktiese effek toon dat die normale pasiënte aansienlik verskil ten opsigte van die statiengebruikers (figuur 24) en kan in Tabel 15, Bylaag C verkry word ($d \geq 0.8$).

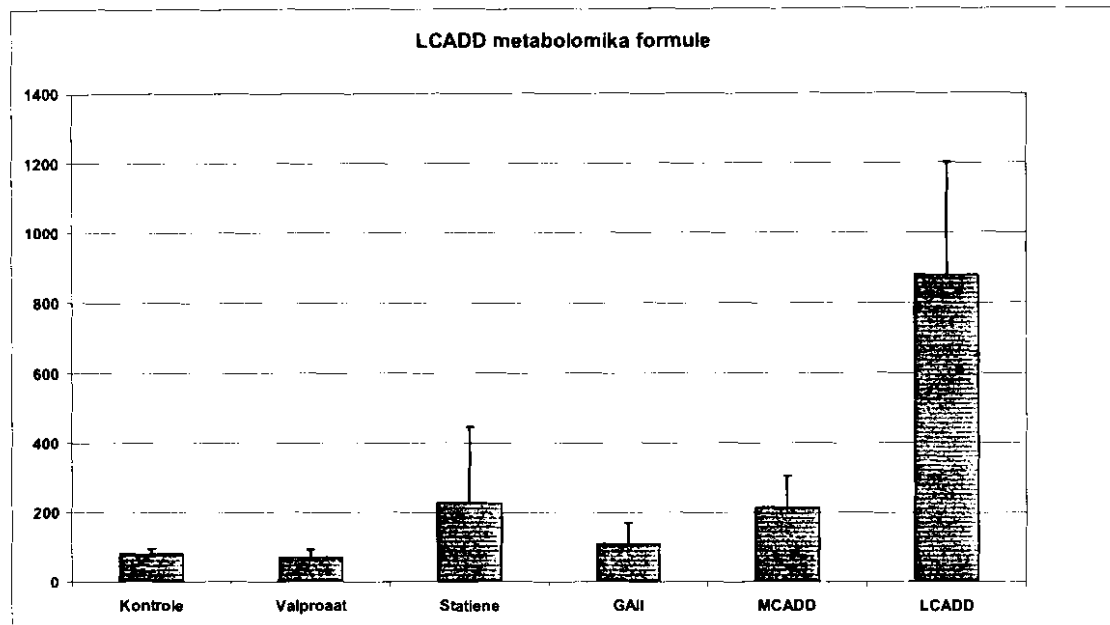
Die kontrolegroep (Hoofstuk 4, 4.1 & Bylaag D) het 'n vaste gebalanseerde dieet gevolg voor die uriene geneem is vir die studie. Die persone van verskillende ouderdomsgroepe se urine is gekollekteer sonder enige vooraf behandeling vir aangebore defekte van vetsuurkatabolisme en het ongekontroleerde diëte gevolg.

As die formule gebruik word, moet daar in gedagte gehou word dat dit bekend moet wees dat die defek wel betrokke is by vetsuuroksidasie en dat die spesifisiteit nie baie hoog is nie.

Die formule was afhanklik van die propionielkarnitienwaardes van die pasiënte. Daarom sal verfyning van die formule in dié geval noodsaaklik wees. As die

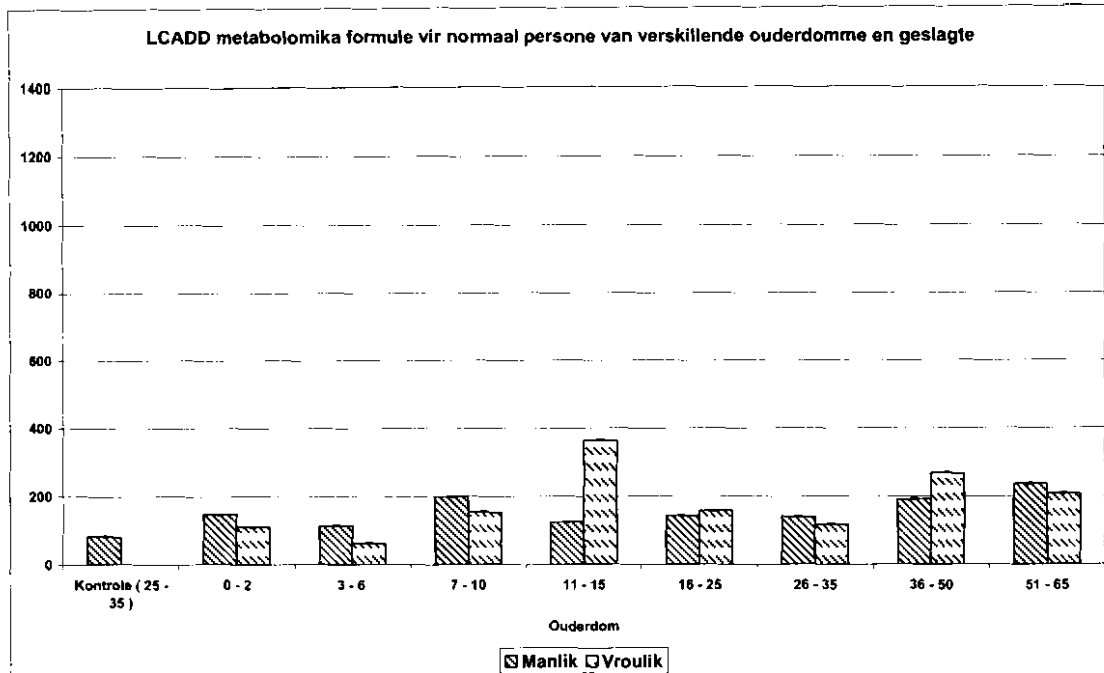
formule sodanig verander word dat propionielkarntien nie so 'n groot rol speel in die bepaling van die waardes nie, kan die probleem moontlik opgelos word.

6.4.2 LCADD metabolomika formule



Figuur 26 : LCADD metabolomika formule wat onderskei tussen verskillende aangebore defekte van vetsuurkatabolisme. Valproaat en statiene is albei medikasies, GAI-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan verkry word in Tabel 7, Bylaag C. Die praktiese effek (Tabel 14, Bylaag C) vir al die pasiënte toon 'n aansienlike verskil ten opsigte van die LCADD formule, behalwe vir MCADD ($d = 0.02$) en GAI ($d = 0.26$).

Die formule tref goeie onderskeid tussen LCADD, kontrole en die ander defekte en medikasies (figuur 26, Tabel 7, Bylaag C, LCADD kolom). Die praktiese effek (Tabel 14, Bylaag C) het geen betekenisvolle verskil tussen die LCADD pasiënte en die GAI- ($d = 0.26$) en MCAD ($d = 0.02$) pasiënte voorspel nie. Daar is ook 'n goeie onderskeid tussen die persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte en LCADD pasiënte (Tabel 7 & 9, Bylaag C). Die statienwaarde 226 ± 221 (figuur 26) se vertrouensinterval was groot en kan in die grense val vir die



Figuur 27 : LCADD metabolomika formule vir normale persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte. Valproaat en statiene is albei medikasies, GAI-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan verkry word in Tabel 9, Bylaag C. Die praktiese effek (Tabel 15, Bylaag C) toon 'n aansienlike verskil tussen die normale pasiënte en die LCADD pasiënte (Figuur 26).

LCADD waarde (877 ± 322).

Die praktiese effek (Tabel 15, Bylaag C) wys op 'n aansienlike verskil tussen die LCADD pasiënte en die kontrole en persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte ($d \geq 0.8$).

Die oorvleueling van die statienewaarde se vertrouensinterval met dié van LCADD (figuur 26), is moontlik die gevolg van die statienemedikasie wat vertraging in vetsuurkatabolisme tot gevolg het. Die moontlikheid bestaan dat daar meer langketting asielkarnitiene uitgeskei kan word in die uriene. Verder kan MCADD en GAI ook inmeng met die LCADD formule weens die gemeenskaplike aard van die metaboliete wat deur die defekte beïnvloed word.

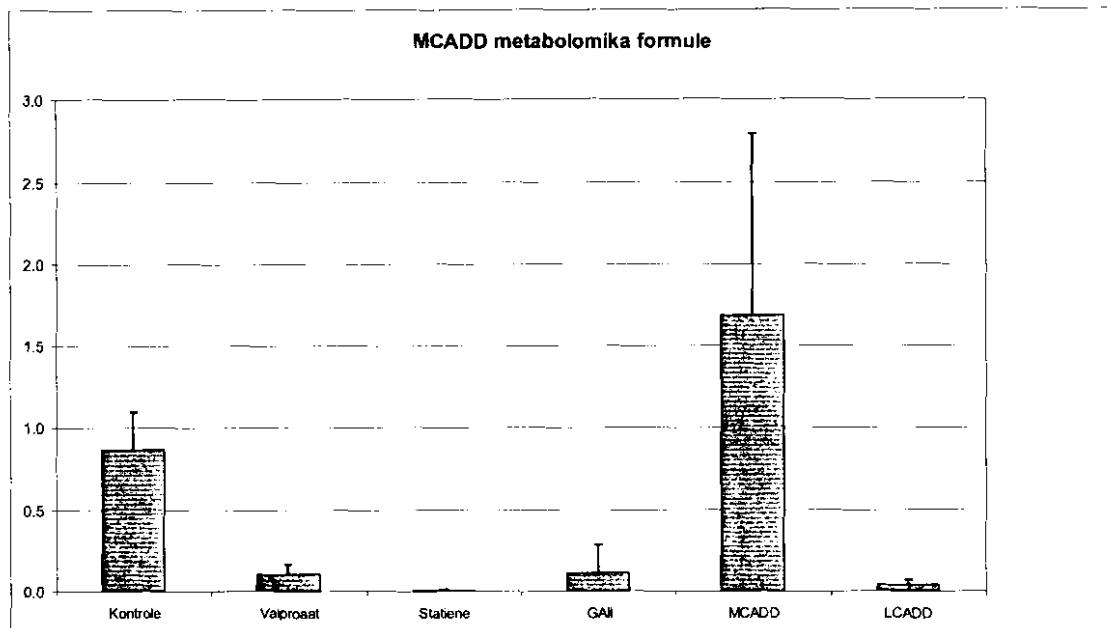
Die jaargroep 11-15 jaar vroulike persone se vertrouensinterval van 363 ± 291 (Figuur 27) kan moontlik oorvleuel met die vertrouensinterval van die LCADD pasiënte in figuur 26. Die praktiese effek (Tabel 15, Bylaag C), aan die ander kant, toon 'n aansienlike verskil aan waar $d = 0.85$. Dit is nie duidelik waarom dit gebeur nie, want die vroulike 11-15 jaargroep persone is bevestig as normaal. Die faktore wat die verhoging vir die betrokke ouderdoms- en geslagsgroep veroorsaak, kan nie verklaar word nie. Die LCADD formule onderskei goed vir die ouderdomsgroepe en geslagte sowel as vir die verskillende defekte en medikasies van vetsuurkatabolisme. Die formule was meer spesifiek gewees.

Langketting asielkarnitiene (versadig en onversadig), propionielkarnitien en asetielkarnitien (3 koolstowwe lank) is verder ingebou om die spesifisiteit van diagnose van LCADD te probeer verhoog. Die hoë statien waarde (Figuur 26) is moontlik toe te skryf aan die feit dat propionielkarnitien in berekening gebring is.

Verdere verfyning van die LCADD formule het die potensiaal om baie goeie onderskeid tussen die verskillende defekte en medikasies te tref. Die formule toon ook die potensiaal om onderskeid te tref tussen verskillende ouderdomsgroepe en geslagte ten opsigte van die LCADD pasiënte.

6.4.3 MCADD metabolomika formule

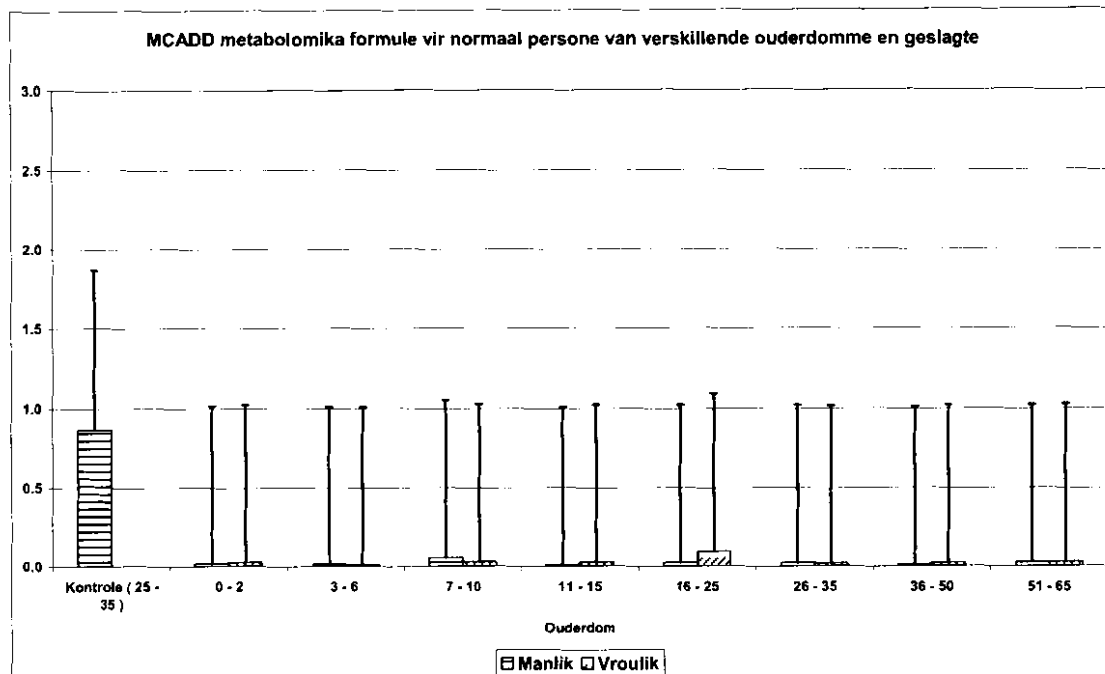
Die formule kan baie goed onderskei tussen MCADD en die ander defekte en medikasies (Figuur 28). Die kontrolewaarde was aansienlike hoë (0.87 ± 0.22) in vergelyking met die MCADD waarde (1.69 ± 1.10) as die 95% vertrouensinterval (Tabel 7, Bylaag C) in ag geneem word. Die praktiese effek bevestig dat daar nie 'n aansienlike verskil is tussen die kontrole ($d = 0.39$) en die MCADD pasiënte nie.



Figuur 28 : MCADD metabolomika formule wat onderskei tussen verskillende aangebore defekte van vetsuurkatabolisme. Valproaat en stabiene is beide medikasies, GAI-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan verkry word in Tabel 7, Bylaag C. Die praktiese effek het 'n aansienlike verskil getoon tussen die MCADD pasiënte en die ander pasiënte (Tabel 14, Bylaag C) behalwe vir die kontrolewaarde ($d = 0.39$).

Daar is nie 'n verklaring waarom die waarde vir die kontrole oorvleuel met die MCADD waarde nie. Die kontrolepasiënte (Hoofstuk 5 se proefpersone met vaste dieet, Bylaag D) se dieet het moontlik hoë konsentrasies mediumketting vetsure bevat. In die ontwerp van die MCADD formule (Hoofstuk 3.3.3) is hoofsaaklik mediumketting vetsure en asetielkarnities gebruik. As die kontrolegroep verhoogde mediumketting vetsure deur die dieet ingeneem het, kon dit die MCADD formule beïnvloed het.

Die formule onderskei duidelik tussen die kontrole, MCADD pasiënte en persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte (figuur 28 & 29). Die waardes vir figuur 28 en 29 kan gevind word in bylaag C, Tabel 7 (MCADD kolom) en in Tabel 10. Die formule is baie spesifiek vir MCADD pasiënte.

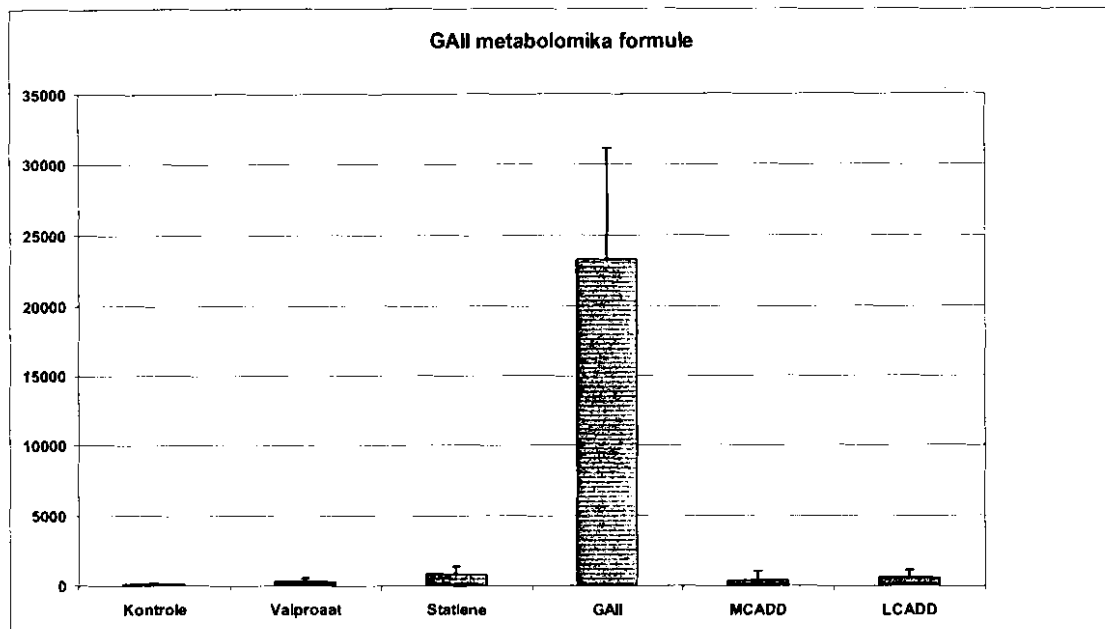


Figuur 29 : MCADD metabolomika formule vir normaal persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte. Valproaat en statiene is albei medikasies, GAll-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan verkry word in Tabel 10, Bylaag C. Die praktiese effek (Tabel 15, Bylaag C) toon aansienlike verskille aan tussen die MCADD pasiënte (Figuur 29) en die normale pasiënte.

6.4.4 GAll metabolomika formule

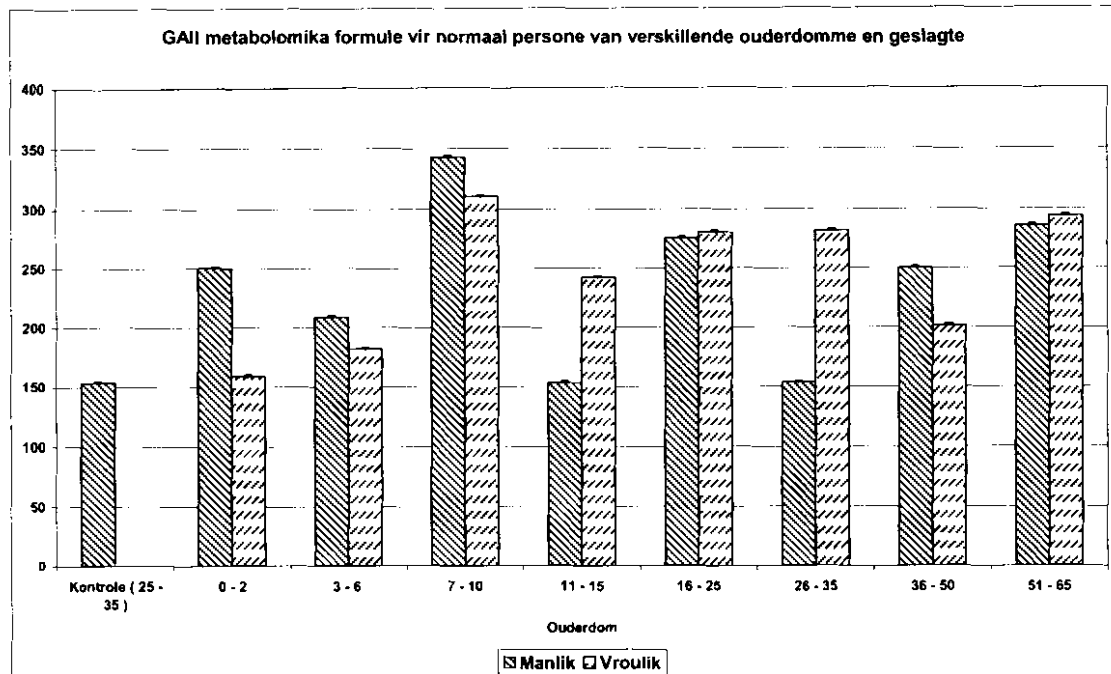
Die formule vir Glutaarsuururie Tipe II (GAll) was hoogs spesifiek vir die betrokke defek en kon goed onderskei tussen al die verskillende defekte en medikasies wat vergelyk is (figuur 30). Daar was weer eens 'n goeie onderskeid tussen die kontrola en die persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte (figuur 31) asook met die Glutaarsuururie Tipe II pasiënte in figuur 30. Tabel 7 (GAll kolom) en Tabel 11 in Bylaag C kan vergelyk word om die stellings te bevestig.

Die 95% vertrouensintervalle word telkens ondersteun deur die waardes van die praktiese effek wat aansienlike verskille tussen die GAll pasiënte en al die ander pasiënte groeperings toon (Tabel 14 en 15, Bylaag C).



Figuur 30 : GAI metabolomika formule wat onderskei tussen verskillende aangebore defekte van vetsuurkatabolisme. Valproaat en statiene is albei medikasies, GAI-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan verkry word in Tabel 7, Bylaag C. Die praktiese effek toon aansienlike verskille aan tussen die GAI pasiënte en die res van die pasiënte (Tabel 14, Bylaag C).

Die hoë spesifisiteit van die formule kan moontlik toegeskryf word aan die metabolietgroeperings wat in ag geneem is om die formule te ontwerp (Hoofstuk 3.3.1). As die GAI defek in ag geneem word, word 'n wye verskeidenheid van ensieme en so ook metaboliete geaffekteer. Daar is dus baie relevante metaboliete ingesluit om die aard van die defek te weerspieel. Dit sluit kort-, medium- en langketting asielkarntiene in en ook asielkarnitiene wat afkomstig is vanaf die vertakte ketting aminosuurkatabolisme.



Figuur 31 : GAI metabolomika formule vir normaal persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte. Valproaat en statiene is albei medikasies, GAI-Glutaric aciduria Type II, MCADD-Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect en LCADD-Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect. Waardes kan verkry word in Tabel 11, Bylaag C. Die praktiese effek verskil aansienlik tussen die GAI pasiënte (Figuur 31) en die normale pasiënte (Tabel 15, Bylaag C).

'n Interessante verskynsel is dat die statiene waarde in figuur 30 baie meer uitgehef is as die ander defekte en medikasies onder beskouing. Dit is moontlik toe te skryf aan die effek wat statiene het op die koënsiem Q10 konsentrasies. Statiene verlaag sellulêre ubiquinone konsentrasies en ubiquinone speel 'n belangrike rol in elektronoordrag in die elektrontransportketting (Paepe *et al.*, 2005; Altekin *et al.*, 2002). Gevolglik kan dit dan 'n skynbeeld of induksie van glutaarsuururie tipe 2 tot gevolg hê (Mienie 2006, *persoonlike gesprek*).

6.5 Samevattende bespreking: Asielkarnitien vergelykings vir heterosigote en homosigote wat aan aangebore defekte van vetsuurkatabolisme ly

Die doel met die asielkarnitien vergelykings was om 'n verdere vlak van verfyning in diagnose van vetsuurmetabolismeafwykings daar te stel. Dit was ongelukkig net gedeeltelik suksesvol, aangesien die ontwikkelde formules net in sekere gevalle effektief gebruik kon word, om tussen verskillende aangebore afwykings te onderskei.

Verskille in dieet kan 'n groot invloed hê in metaboliet se konsentrasies in uriene ten spyte van die feit dat alle analyses identies gedoen is. Hou verder ingedagte dat die LC-MSMS 'n 10% variasie het in die akkuraatheid van analyses.

Die doel van die ontwikkelde formules was om onderskeid te probeer tref tussen die verskillende defekte en medikasies. Nie alle rolspelende faktore kan in ag geneem word nie. Faktore soos dieet, omgewing (hitte, koue, humiditeit, ens.) en emosionele welstand (stres, depressie, veg-of-vlug instink, ens.) kan 'n moontlike effek op metabolisme en gevolglik op die metabolietkonsentrasies hê. Verdere wiskundige kennis sal nodig wees om die formules te verfyn, asook 'n beter begrip van *in vivo* metabolisme.

HOOFSTUK 7

SAMEVATTENDE GEVOLGTREKING OOR DIE STUDIE

Die literatuur en ook die verkrygte resultate maak dit duidelik dat 'n globale beeld van metabolisme, wat die betrokke metaboliete insluit, 'n beter beeld verskaf van die werklike gebeure op metabolietvlak.

Die 25 proefpersone wat die karnitienbelading ontvang het, het betekenisvolle toenames in slegs die ketoon- en asielkarnitienkonsentrasies getoon (Hoofstuk 5). Daar kan dus aangeneem word dat, behalwe vir die stimulerende effek op fase 2 detoksifisering, karnitienbelading 'n verandering in vrye karnitien en asielkarnitien metabolisme tot gevolg sal hê. Die effek van die karnitienbelading het 'n merkbare verskil gemaak in metabolietgroeperings. Die verskil was nie in alle gevalle betekenisvol nie, maar 'n tendens in verandering van metabolietkonsentrasies kon waargeneem word. Die sekondêre doel van die studie is bereik aangesien 'n nuut ontwerpte metabolomika benadering gebruik is om vas te stel wat die effek van L-karnitienbelading op die totale energiemetabolisme van metabolies normale proefpersone is.

Die metabolietgroeperingseksperiment wat ontwerp is, is gebruik op twee gesinne (een met MCADD en een met Glutaarsuururie Tipe II). Die ouers van beide gesinne was heterosigote en hulle kinders almal homosigote. Dit is deur molekulêre toetse bevestig. Beide die homosigotiese en heterosigotiese lede van die gesinne het aansienlike verhogings gehad in metabolietkonsentrasies. Alhoewel die heterosigote se metabolietkonsentrasies nie verhoog was vir alle metabolietgroeperings nie, was die verhogings tog duidelik sigbaar. Die metabolomika benadering van liniêre sommering van metaboliete wat betrokke is by mitochondriale β -oksidase, was suksesvol. Die heterosigote kon gediagnoseer word op grond van die metaboliete wat in die uriene uitgeskei is.

Homosigote het baie verlaagde tot geen ensiemaktiwiteit vir 'n betrokke defek nie, omrede beide allele van die koderende geen of gene vir die betrokke ensiem defek is. Opeenhoping van die metaboliet of metaboliëte wat deur die geen gekataliseer sou word, kan nou toksies word vir die liggaam. Die metaboliëte ondergaan dan verskillende detoksifiseringsmeganismes en word uitgeskei in die uriene en dien dan as biomerkers vir 'n betrokke defek. Die biomerkers word dan met behulp van GC-MS (organiese sure) en LC-MSMS (asielkarnitiene) analises opgespoor. Individuele biomerkers word onder beskouing geplaas om dié defek te diagnoseer.

Heterosigote behou genoegsame ensiemaktiwiteit vir 'n betrokke defek en daar is dan min tot geen opspoorbare konsentrasies van biomerkers in die uriene nie. Die individuele biomerkers val dan binne normaalgrense wat in die literatuur verkry kan word.

Die primêre doel is dus bereik: Heterosigote is deur middel van organiese suur analises en ook asielkarnitiën analises in die uriene opgespoor met behulp van die nuwe metabolomika gebaseerde benadering.

Die verdere doel was om met behulp van asielkarnitiënverhoudings formules te probeer onderskei tussen verskillende mitochondriale β -oksidase defekte. Die formules is nog nie perfek nie, maar daar kon redelik onderskei word tussen die verskillende defekte. Die effektiwiteit van die formules is beperk en moet eers beproef word met genoegsame data en verdere wiskundige verfyning.

HOOFSTUK 8

VOORSTELLE VIR SOORTGELYKE TOEKOMSTIGE STUDIES

In die studie was daar nie gepoog om 'n absolute en beslissende antwoord te verkry op metabolomika of metabolomika gebaseerde navorsing nie. Daar is wel gepoog om te bepaal of dit die moeite werd sal wees om 'n metabolomika gebaseerde studie toe te pas om aangebore defekte van metabolisme op te spoor in die geval van heterosigotiese pasiënte. Die studie was suksesvol.

Vir toekomstige studies in die metabolomika veld is daar wel voorstelle. In die Suid-Afrikaanse milieu is dit baie moeilik om proefpersone vir lang tydperke onder ideale protokol vereistes te plaas. Om mense op te neem in die hospitaal en 'n vaste dieet te verskaf kan problematies wees, weens die diverse dieet wat onder die Suid Afrikaanse bevolking voorkom. Verder sal bitter min mense instem om in 'n hospitaal opgeneem te word, veral in die armer dele van die land. 'n Dag sonder werk is 'n dag minder se geld. Kospakkies wat huis toe geneem kan word, kan moontlik werk, maar daar sal nie kontrole gehou kan word of die proefpersoon die dieet volg en of die kos weggegooi word of onder familie versprei word nie. Die beste idee sal wees om vaste etenstye by 'n goedgekeurde sentrum te gee waar die proefpersone kan inkom en dan die kos kry, daar eet en dan weer huis toe gaan.

'n Proefgroep sal 'n weerspieëling moet hê van die totale samestelling van die betrokke bevolking. Voordat so iets gepoog word, moet daar eers bepaal word wat die voorkoms van die aangebore defekte van metabolisme in Suid Afrika is. Dan kan 'n proefgroep saamgestel word wat die frekwensie van die defek onder beskouing weerspieël.

Uriene volgens my nie die beste liggaamsmateriaal om analyses op uit te voer nie, weens die hoë voorkoms van bakteriële kontaminasie wat voorkom nie. 'n Voorstel sal wees om bloed te trek en sodoende dan eksperimentele werk te doen op die serum en plasma. Om bloed te trek, is wel meer indringend op die persoon, maar 'n meer korrekte beeld van die metabolisme kan sodoende verkry word. In die meerderheid van metabolomika studies word daar in elk geval eerder met die serum of plasma gewerk as met uriene.

Wat die analyses self betref stel ek voor dat die LC-MSMS gebruik moet word eerder as die GC-MS. Een rede hiervoor is dat die voorbereiding van die monsters vir LC-MSMS analyses minder arbeidsintensief is as die GC-MS se monstervoorbereiding. So kan die menslike faktor 'n kleiner rol speel op die analise. Verder is die LC-MSMS se sensitiwiteit hoër as die GC-MS s'n. Met die LC-MSMS is daar 'n 10% variasie in resultate verkry terwyl die GC-MS 'n 25% variasie toon met resultate. Die GC-MS moet nie heeltemal uit die studies gelaat word nie, want dit kan baie goeie ondersteunende data lewer wat die verklaring van resultate van die LC-MSMS vergemaklik.

Metabolomika is wel die studie van die geheelbeeld van die metaboolom, maar daar moet in gedagte gehou word dat, om 'n beter begrip te verkry, moet daar op 'n punt begin word en dan vandaar uitgebrei word. Sou daar met die studie voortgegaan word, moet daar definitief meer aandag gegee word aan die butanoaatmetabolisme, asook die vertakte ketting aminosuurkatabolisme. Vandaar kan byvoorbeeld uitgebrei word en kan die koolhidraatmetabolisme ook in ag geneem word.

Daar moet nie uit die vorige paragraaf afgelei word dat metaboliese weë uitgesonder word nie. Inteendeel, die analyses kan op die "shotgun" benadering gedoen word, waar daar analyses gedoen word vir soveel moontlik metaboliese weë. Dit is by die interpretering van die data, waar ek sal aanraai dat die

metaboliese weë individueel ondersoek en dan geïntegreer word ná 'n geheelbeeldvoorstelling.

Verder, indien dit moontlik is, sal daar 'n beter begrip verkry word van die metaboolom as die betrokke ensiemsisteme wat by die metabolismes betrokke is, ook bestudeer word.

LITERATUUR VERWYSINGS

ACARA, M.A., LOHR, J.W. & WILLSKY, G.R. 1998. Renal Drug Metabolism. *Pharmacological Reviews*, 50(1):107-135.

AKCETIN, Z. & BOHLES, H.J. 1987. Ketogenic effects of high and low levels of carnitine during total parenteral nutrition in the rat. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 46:47-51.

ALTEKIN, E., CALISKAN, S., COKER, C., GUNERI, S. & ONVURAL, B. 2001. The Effect Of Simvastatin Treatment On Plasma Ubiquinone, Blood ATP Concentrations, Total Antioxidant Capacity And Muscle Related Markers. *Turkish Journal Of Medical Science*, 32:323-328, Oct.

ALVAREZ-VASQUEZ, F., SIMS, K.J. & VOIT, E.O. 2004. Analysis of dynamic labeling data. *Mathematical Biosciences*, 191:83-99, Jul.

ANDRESEN, B.S., CAMPISTOL, M.A.V., CURCOY, A., GREGERSON, N., OLSEN, R.K.J., OSORIO, J.H., RIBES, A. & TRENCHS, V. 2003. Late-onset form of β -electron transfer flavoproteien deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, 78:247-249, Jan.

ANDRE, K.R., BARSCHAK, A.G., DUTRA FILHO, C.S., FERREIRA GDA, C., SCHUCK, P.F., TONIN, A., VARGAS, C.R., VIEGAS, C.M., WAJNER, M., WANNMACHER, C.M. & WYSE, A.T. Inhibition of the electron transport chain and creatine kinase activity by ethylmalonic acid in human skeletal muscle. *Metabolic Brain Disorders*, 21(1):11-9, Apr 2006.

BARRET, D. 2005. Introduction to metabolomics. (Voodrag van 'Centre of Analytical Biochemistry, School Of Pharmacy, University Of Nottingham', datum onbekend). Nottingham. [Web:] <http://plantsci.arabidopsis.info/pg/barratt.pdf> [Datum van gebruik: 5 Sep. 2005].

BEECHER, C.W.W. 2005. Chapter 17: The Human Metabolome. [Web:] <http://www.metabolon.com/pdf/chapter17.pdf> [Datum van gebruik: 11 Feb. 2005]

BENNET, M.J., MATERN, D. & RINALDO, P. 2002. Fatty acid oxidation disorders. *Annual Review of Physiology*, 64:477-502, Mrt.

BERDEN, J.A., BRINDLE, K.M., KELL, D.B., OLIVER, S.G., RAAMSDONK, L.M., ROADHURST, D., ROWLAND, J.J., TEUSINK, B., VAN DAM, K., WALSH, M.C. & WESTERHOFF, H.V. 2001. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature Publishing Group*, 19:45-50, Jan.

BLASKOVICS, M.E., BLAU, N., DURAN, M. & GIBSON, K.M. 2005. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. 2nd ed. Springer. 309-334 p.

BLIZNAKOV, E.G. 2002. Coenzyme Q10, Lipid Lowering Drugs (Statins) and Cholesterol: A Present Day's Pandora's Box. *The Journal Of American Neurtaceutical Association*, 5(3):32-38.

BRASS, E.P. & HIATT, W.R. 1998. The Role Of Carnitine And Carnitine Supplementation During Exercise In Man And In Individuals With Special Needs. *Journal Of The American College Of Nutrition*, 17(3):207-215.

CAIRNS, P.A. & STALKER, D.J. 2000. Carnitine supplementation of parenterally fed neonates. *Cochrane Database System Review*, 4:CD000950.

CHARLTON, A., GODWARD, J. & STONES, R. NMR Manager – Metabolomics Database Application for Interpreting NMR spectra. (<http://bioinformatics.csl.gov.uk>). [15 Apr. 2005]

CHURCH, G.M., KHARCHENKO, P. & VITKUP, D. 2005. Expression dynamics of a cellular metabolic network. *Molecular Systems Biology*, Aug.

CLARKE, S., DUMLOA, D.S., HAU, J. & KATZ, J.E. 2003. A New Technique (COMSPARI) to Facilitate the Identification of Minor Compounds in Complex Mixtures by GC/MS and LC/MS: Tools for the Visualization of Matched Datasets. *American Society for Mass Spectrometry*, 15:580-584, Des.

COOK, G.A., CORNELL, N.W. & OTTO, D.A. 1983. Malonyl-CoA inhibition of carnitine palmitoyltransferase: interpretation of I50 and Ki values. *Biochemical Journal Letters*, 212:525-527, Jan.

CRAVATT, B.J., HAWKINS, E.G., SAGHATELIAN, A., SUIZDAK, G., TRAUGER, S.A. & WANT, E.J. 2004. Assignment of endogenous substrates to enzymes by global metabolite profiling. *Biochemistry*, 43:14332-14339, Okt.

CRAVATT, B.F., SAGHATELIAN, A. 2005a. Global strategies to integrate the proteome and metabolome. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9:62–68, Jan.

CRAVATT, B.F., SAGHATELIAN, A. 2005b. Discovery metabolite profiling - forging functional connections between the proteome and metabolome. *Life Sciences*, 77:1759–1766.

CZECH, E., KAMIN, M., NOWACZY, G., NOWICKA, J., OLSZOWY, Z., PLEWKA, A. & PLEWKA, D. 2006. Effect of L-carnitine supplementation on xenobiotic metabolizing hepatic enzymes exposed to methanol. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57:427-435, Mar.

DAVIS, C.D. & MILNER, J. 2004. Frontiers in nutrigenomics, proteomics, metabolomics and cancer prevention. *Mutation Research*, 551:51-64, Jun.

DE PAEPE, B., LAAKSO, J., LAAKSONEN, R., LEHTIMAKI, T., LUTJOHANN, D., MATTILA, K.M., PAIVA, H., SMET, J., THELEN, K.M., VAN COSTER, R. & VON BERGMANN, K. 2005. High-dose statins and skeletal muscle metabolism in humans: A randomized, controlled trial. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 78(1):60-68, Mar.

DUNLOP, J.L. & HALESTRAP, A.P. 1986. Intramitochondrial regulation of fatty acid β -oxidation occurs between flavoproteien and ubiquinone. *Biochemical Journal*, 239:559-565.

DUNN, W.B. & ELLIS, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(4):285-294.

DURAN, M., IJLTS, L., JAKOBS, C., RUITER, J.P.N., SILVA, M.F.B., TAMARES DE ALMEIDA, I. & WANDERS, R.J.A. 2001. Differential effect of valproate and its Δ -2- and Δ -4-unsaturated metabolites, on the β -oxidation rate of long-chain and medium-chain fatty acids. *Chemico-Biological Interactions*, 137:(203–212), Apr.

FEKETE, T., GREGUS, Z., KLAASSEN, C.D. & VARGA, F. 1992. Availability of glycine and coenzyme A limits glycine conjugation in vivo. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 20(2):234-240, Mrt.

FIEHN, O. & WECKWERTH, W. 2002. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:156–160.

FIEHN, O., TANAKA, N. & TOLSTIKOV, V.V. 2004. Metabolomics: LC-MS Analysis Development. *Plant Molecular Biology*, 48:155-171.

FRIDMAN, E. & PICHERSKY, E. 2005. Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products. *Current Opinion In Plant Biology*, 8:1-7.

GOODACRE, R. 2004. Making sense of the metabolome using evolutionary computation: seeing the wood with the trees. *Journal of Experimental Botany*, 56(410):245-254, Jan.

GHASSEMIAN, M. & LANGE, B.M. 2005. Comprehensive post-genomic data analysis approaches integrating biochemical pathway maps. *Phytochemistry*, 66:413-451, Jan.

GRICE, A.S. & PECK, T.E. 2001. Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency: A rare cause of acidosis with an increased anion gap. *British Journal Of Anaesthesia*, 86(3):437-441, Okt.

GRODY, W.W. & RICHARDS, C.S. 2004. Prenatal diagnosis of cystic fibrosis: past, present and future. *Expert Review In Molecular Diagnosis*, 4(1):49-62.

GUDJONSSON, H., LI, B.U.K., LLOYD, M.L., OLSEN, W.A. & SHUG, A.L. 1992. The effect of enteral carnitine administration in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55:838-845.

HEIJNEN, J.J., VAN GULIK, W.M., VAN WINDEM W.A. & WU, L. 2005. Application of metabolome data in functional genomics: A conceptual strategy. *Metabolic Engineering*, 7:302-310, Jul.

HOEFSLOOT, H.C.J., JANSEN, J.J., SMILDE, A.K., TIMMERMAN, M.E. & VAN DER GREEF, J. 2005. Multilevel component analysis of time-resolved metabolic fingerprinting data. *Analytica Chimica Acta*, 530:173-183.

HOFFMANN, G.F., KOHLMULLER, D., KOLKER, S., LINDNER, M. MAYATEPEK, E., OKUN, J.G. OLGEMOLLER, K., SCHULZE, A. & WANDERS, R.J.A. 2002. A method for quantitative acylcarnitine profiling in human skin fibroblasts using unlabelled palmitic acid: diagnosis of fatty acid oxidation disorders and differentiation between biochemical phenotypes of MCAD deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1548:91-98, Sept.

INAL, T.C., OZER, G., YUKSEL, B. & YURIKER, G. 2000. Detection of cystic fibrosis $\Delta F508$ Mutation in the Cukurova Region. *Turkish Journal Of Medical Science*, 30:607-609, Jan.

JONKER, E. 1995. Opklaring Van 'n Kataboliese Weg Vir Metielsuksiensuur In Die Mens. (Verhandeling ingehandig by 'Departement Biochemie by die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys ter gedeeltlike voldoening aan die vereiste vir die graad Magister Scientiae in Biochemie in Desember 1995.) Potchefstroom. (Gepubliseer.)

KELL, D.B. 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology*, 7:296–307, May.

KELLY, G.S. 2001. L-Carnitine: Therapeutic applications of a conditionally-essential amino acid. *Alternative Medicine Review*, 3(5):345-360.

LISKA, D.J. 1998. The Detoxification Enzyme Systems. *Alternative Medicine Review*, 3(3):187-198.

MATERN, D., SHEKHAWAT, P.S. & STRAUSS, A.W. 2005. Beta Fatty Acid Oxidation Disorders, Their Effect On Maternal Health And Neonatal Outcome: Impact Of Expanded Newborn Screening On Their Diagnosis And Management. *Pediatric Research*, 5(57):78-81, Jan.

MITCHELL, M.E. 1978. Carnitine metabolism in human subjects I. Normal metabolism. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31:293-306, Feb.

OMIM. 2005. Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency. Johns Hopkins University. [Web:] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=231680>. [Datum van gebruik: 14 Okt. 2005]

OMIM. 2005. Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency. Johns Hopkins University. [Web:] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?cmd=entry&id=201450>. [Datum van gebruik: 14 Okt. 2005]

OMIM. 2005. Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase deficiency. Johns Hopkins University. [Web:] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=201460> [Datum van gebruik: 14 Okt. 2005]

RAJASIMHA, H.K. 2004. PathMeld: A Methodology for the Unification of Metabolic Pathway Databases. (Tesis ingehandig aan die fakulteit van 'Virginia Polytechnic Institute and State University' as gedeeltelike voldoening van die vereistes vir die graad M.Sc. in Rekenaar Wetenskap En Toepassings in Desember 2004.) Blacksburg, Virginia. (Gepubliseer.)

REBOUCHE, C.J. & SEIM, H. 1998. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annual Review of Nutrition*, 18:39-61, Jul.

REBOUCHE, C.J. 2004. Kinetics, Pharmacokinetics, and Regulation L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1033:30-41, Nov.

ROE, C.R. 2002. Inherited disorders of mitochondrial fatty acid oxidation: a new responsibility for the neonatologist. *Seminar in Neonatology*, 7:37-47.

SHAFI, M. 1998. Carnitien supplementation and exercise. *Nutrition Bytes*, 2(4): 1-7.

SINGH, R.H., VOCKLEY, J. & WHITEMAN, D.A.H. 2002. Diagnosis and management of defects of mitochondrial β -oxidation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 5(6):601-609, Nov.

STRUMILO, S. 2005. Short term regulation of of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochimica Polonica*, 4(52):759-764, Jul.

BYLAAG A

TABEL VAN P-WAARDES EN BONFERRONI P-WAARDES

Tabel 2: Berekende p-waardes vir die gemiddeldes van die verskille vir metabolietkonsentrasies vir verskillende karnitienbeladingstye ($p < 0.05$ dui op statistiese betekenisvolle verskil, p_B is die Bonferroni p-waarde waar $p_B < 0.05$ dui op statisties betekenisvolle verskil). T0 is die waarde voor karnitien belading, T2 is die waarde verkry 24 uur na belading en T3 is die waarde na 7 dae van belading.

	Figuur	T2-T0		T3-T0	
		p-waarde	p_B -waarde (p-waarde x2)	p-waarde	p_B -waarde (p-waarde x2)
Vrye karnitien	Figuur 14, p.61	0.0487	0.0974	0.0003	0.0006
Totale Asielkarnitiene	Figuur 14, p.61	0.2440	0.4880	0.0002	0.0004
Vrye Karnitien : Asielkarnitien	Figuur 15, p.62	0.1847	0.3694	0.0748	0.1496
Ketone	Figuur 16, p.64	0.1700	0.3400	0.0312	0.0624
Krebs- intermediêre	Figuur 17, p.66	0.0288	0.0576	0.1833	0.3666
Totale Dikarboksielsure	Figuur 16, p.64	0.0598	0.1196	0.0377	0.0754
Tradisionele Dikarboksielsure	Figuur 16, p.64	0.1924	0.3848	0.0257	0.0514
Glisienkonjugate	Figuur 18, p.68	0.4752	0.9504	0.2540	0.5080

BYLAAG B
TABELLE VAN GEMIDDELDDES,
STANDAARDAFWYKINGS EN VERTROUENS
INTERVALLE

Tabel 3: Gemiddeldes vir metaboliet konsentrasieveranderings tydens karnitienbeladings (n = 25). (T0, T2 en T3 is onderskeidelik die waardes vir geen karnitienbelading, 24 uur na belading en na 7 dae van karnitienbelading voor).

	Eenheid	Figuur	T0	T2	T3
Vrye Karnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 14, p.61	1.156	1.313	1.931
Totale Asielkarnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 14, p.61	1.576	1.687	2.374
Vrye Karnitien : Asielkarnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 15, p.62	0.761	0.817	0.861
Ketone	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	14.44	15.97	17.83
Krebssiklus intermediêre	mg/g Kreatinien	Figuur 17, p.66	189.51	149.44	212.76
Totale Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	8.19	9.12	13.46
Tradisionele Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	2.48	2.76	4.47
Glisienkonjugate	mg/g Kreatinien	Figuur 18, p.68	0.22	0.22	0.16

Tabel 4: Standaardafwykings vir metabolietkonsentrasieveranderings tydens karnitienbeladings (n = 25). (T0, T2 en T3 is onderskeidelik die waardes vir geen karnitienbelading, 24 uur na belading en na 7 dae van belading voor).

	Eenheid	Figuur	T0	T2	T3
Vrye Karnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 14, p.61	0.422	0.394	0.683
Totale Asielkarnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 14, p.61	0.697	0.674	0.856
Vrye Karnitien : Asielkarnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 15, p.62	0.180	0.226	0.239
Ketone	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	4.96	8.36	10.42
Krebs-intermediêre	mg/g Kreatinien	Figuur 17, p.66	82.83	86.65	124.99
Totale Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	2.89	3.55	14.64
Tradisionele Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	1.31	1.39	4.80
Glisienkonjugate	mg/g Kreatinien	Figuur 18, p.68	0.38	0.33	0.31

Tabel 5: 95% Vertrauensintervalle vir metaboliet konsentrasie veranderings tydens karnitien beladings (n = 25). (T0, T2 en T3 is onderskeidelik die waardes vir geen karnitien belading, 24 uur na belading en na 7 dae van belading voor).

	Eenheid	Figuur	T0	T2	T3
Vrye karnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 14, p.61	0.165	0.154	0.268
Totale Asielkarnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 14, p.61	0.273	0.264	0.335
Vrye karnitien : Asielkarnitien	mmol/mol Kreatinien	Figuur 15, p.62	0.070	0.089	0.094
Ketone	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	1.95	3.28	4.08
Krebssiklus intermediêre	mg/g Kreatinien	Figuur 17, p.66	32.47	33.97	49.00
Totale Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	1.13	1.39	5.74
Tradisionele Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	Figuur 16, p.64	0.51	0.55	1.88
Glisienkonjugate	mg/g Kreatinien	Figuur 18, p.68	0.15	0.13	0.12

BYLAAG C
TABELLE VAN NUMERIESE WAARDES VIR LINIÛRE
SOMMERING EN ASIELKARNITIENVERHOUDINGS
GRAFIEKE VAN HETERO- EN HOMOSIGOOT PASIÛNTE

Tabel 6: Numeriese waardes volgens die liniêre sommering benaderings vir metabolietkonsentrasies van homo- en heterosigoot pasiënte, wat ly aan aangebore defekte van vetsuurkatabolisme. Die Kontrole is T0 van Hoofstuk 5 en bylaag A en B. Figure 19 tot 23 se waardes is in die tabel).

	Eenheid	Figuur	Kontrole (Gemiddeld en 95% VI)	Glutarsuur Urie Tipe II				MCADD		
				Pa	Ma	Kind 1	Kind 2	Pa	Ma	Kind 1
Vrye karnitien	mmol/mol Kreatinien	19	1.156 ± 0.165	4.216	3.714	8.771	0.520	1.737	2.407	4.502
Totale Asielkarnitien	mmol/mol Kreatinien	19	1.576 ± 0.273	3.303	4.026	5.438	0.896	2.214	4.272	11.942
Vrye karnitien : Asielkarnitien	-	20	0.761 ± 0.070	0.783	1.064	0.620	1.724	1.275	1.775	2.653
Ketone	mg/g Kreatinien	21	14.44 ± 1.95	29.87	65.68	28.72	24.37	70.95	54.14	310.36
Krebssiklus intermediêre	mg/g Kreatinien	22	189.51 ± 32.47	370.34	326.31	289.45	538.88	423.31	353.71	451.23
Totale Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	21	8.19 ± 1.13	8.17	119.26	14.75	8.72	26.16	17.32	138.57
Tradisionele Dikarboksielsure	mg/g Kreatinien	21	2.48 ± 0.51	0.00	35.02	3.65	3.10	5.35	3.84	28.97
Glisienkonjugate	mg/g Kreatinien	23	0.22 ± 0.15	0.27	1.36	6.08	5.72	0.55	2.03	19.35

Tabel 7: Numeriese waardes volgens die asielkarnitienverhoudings vir homosigoot pasiënte wat aan aangebore defekte van metabolisme ly. Die Kontrole is die T0 waarde van die 25 normale proefpersone in Hoofstuk 5 waarop die betrokke asielkarnitienformule toegepas is. (Figuur 24 – Statiene Formule, Figuur 26 –LCADD Formule, Figuur 28 – MCADD Formule en Figuur 30 – GAI Formule)

Pasiënte (Aantal pasiënte)	Asielkarnitien Formule			
	Statiene (Gemiddeld en 95% Vertrauensinterval) (Figuur 15)	LCADD (Gemiddeld en 95% Vertrauensinterval) (Figuur 17)	MCADD (Gemiddeld en 95% Vertrauensinterval) (Figuur 19)	GAI (Gemiddeld en 95% Vertrauensinterval) (Figuur 21)
Valproaat (n=53)	0.25 ± 0.08	70 ± 23	0.11 ± 0.06	378 ± 184
Statiene (n=4)	2.74 ± 0.91	226 ± 221	0.02 ± 0.01	565 ± 518
Glutaarsuururie Tipe II (GAI) (n=5)	0.13 ± 0.15	109 ± 61	0.11 ± 0.11	23341 ± 7783
MCADD (n=4)	0.11 ± 0.11	213 ± 93	1.69 ± 1.10	448 ± 592
LCADD (n=14)	0.53 ± 0.23	877 ± 322	0.04 ± 0.03	636 ± 460
Kontrole (n=25)	0.03 ± 0.01	82 ± 12	0.87 ± 0.22	153 ± 44

Tabel 8: Numeriese waardes volgens die statien asielkarnitien verhouding vir kontrolepasiënte asook normaalpasiënte van verskillende ouderdomsgroepe. Die Kontrole is die T0 waarde van die 25 normaal proefpersone in Hoofstuk 5 waarop die statien asielkarnitien formule toegepas is (Figuur 25).

Ouderdom (jare)	Asielkarnitien Formule					
	Statiene					
	Manlik (n)			Vroulik (n)		
	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)
0 - 2	1.17	0.40	11	0.95	0.29	17
3 - 6	1.47	0.36	26	0.77	0.32	10
7 - 10	1.45	0.69	16	1.17	0.62	13
11 - 15	1.57	0.71	10	0.81	0.30	3
16 - 25	2.02	1.48	29	1.73	0.72	16
26 - 35	1.52	0.76	13	1.89	0.82	24
36 - 50	1.69	0.60	45	1.74	0.41	45
51 - 65	1.41	0.51	25	2.18	0.81	37
Kontrole (25 - 35)	0.03	0.01	25			

Tabel 9: Numeriese waardes volgens die LCADD (Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) asielkarnitienverhouding vir kontrolepasiënte asook normaalpasiënte van verskillende ouderdomsgroepe. Die Kontrole is die T0 waarde van die 25 normaal proefpersone in Hoofstuk 5 waarop die LCADD asielkarnitien formule toegepas is (Figuur 27).

Ouderdom (jare)	Asielkarnitien Formules					
	LCADD (Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect)					
	Manlik (n)			Vroulik (n)		
	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)
0 - 2	147	90	11	110	41	17
3 - 6	113	41	26	61	10	10
7 - 10	198	74	16	154	64	13
11 - 15	123	50	10	363	291	3
16 - 25	142	50	29	158	51	16
26 - 35	140	50	13	117	34	24
36 - 50	191	74	45	267	160	45
51 - 65	235	138	25	208	81	37
Kontrole (25 - 35)	82	12	25			

Tabel 10: Numeriese waardes volgens die MCADD (Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase) asielkarnitienverhouding vir kontrolepasiënte asook normaalpasiënte van verskillende ouderdomsgroepe. Die Kontrole is die T0 waarde van die 25 normaal proefpersone in Hoofstuk 5 waarop die MCADD asielkarnitien formule toegepas is (Figuur 29).

Ouderdom (jare)	Asielkarnitien Formules					
	MCADD (Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect)					
	Manlik (n)			Vroulik (n)		
	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)
0 - 2	0.015	0.007	11	0.024	0.017	17
3 - 6	0.013	0.004	26	0.007	0.003	10
7 - 10	0.054	0.068	16	0.029	0.020	13
11 - 15	0.010	0.005	10	0.025	0.018	3
16 - 25	0.023	0.009	29	0.092	0.146	16
26 - 35	0.022	0.011	13	0.016	0.006	24
36 - 50	0.013	0.003	45	0.022	0.009	45
51 - 65	0.025	0.014	25	0.028	0.022	37
Kontrole (25 - 35)	0.869	0.225	25			

Tabel 11: Numeriese waardes volgens die GAI (Glutaarsuururie Tipe II) asiel-karnitiese verhouding vir kontrolepasiënte asook normaalpasiënte van verskillende ouderdomsgroepe. Die Kontrole is die T0 waarde van die 25 normaal proefpersone in Hoofstuk 5 waarop die MCADD asielkarnitiese formule toegepas is (Figuur 31).

Ouderdom (jare)	Asielkarnitiese Formules					
	MCADD (Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Defect)					
	Manlik (n)			Vroulik (n)		
	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)	Gemiddeld	95% Vertrouensinterval (halfwydte)	Aantal pasiënte (n)
0 - 2	250	147	11	158	67	17
3 - 6	209	83	26	182	116	10
7 - 10	343	138	16	310	95	13
11 - 15	153	77	10	242	64	3
16 - 25	275	151	29	280	112	16
26 - 35	153	121	13	282	102	24
36 - 50	250	83	45	202	53	45
51 - 65	286	74	25	294	207	37
Kontrole (25 - 35)	153	44	25			

Tabel 12: Die praktiese effek bereken vir karnities en asielkarnitiene. Die praktiese verskil van die pasiënte ten opsigte van die kontrolewaarde (T0 van Hoofstuk 5, n = 25) is bereken . Die tabel het betrekking tot Figure 19 en 20.

	Praktiese Effek Waarde (d) Vir Karnitiesmetaboliete		
	Vrye karnities (Figuur 19)	Totale Asielkarnities (Figuur 19)	Vrye karnities: Totale Asielkarnities (Figuur 20)
Pa-GAI	7.25	2.48	0.13
Ma-GAI	6.06	3.52	1.80
Kind1-GAI	18.05	5.54	0.78
Kind2-GAI	1.51	0.98	5.36
Pa-MCADD	1.38	0.92	2.86
Ma-MCADD	2.96	3.87	5.64
Kind1-MCADD	7.93	14.88	10.53

Tabel 13: Die praktiese effek bereken vir organiese sure. Die praktiese verskil is bereken wat daarop dui hoe die pasiënte verskil ten opsigte van die kontrolewaarde (T0 van Hoofstuk 5, n = 25). Die tabel het betrekking tot Figure 21 tot 23.

	Praktiese Effek Waarde (d) Vir Organiese Sure				
	Ketone (Fig 21)	Krebssiklus (Fig 22)	Totale Dikarboksielsure (Fig 21)	Tradisionele Dikarboksielsure (Fig 21)	Glisienkonjugate (Fig 23)
Pa-GAI	3.11	2.18	0.01	1.90	0.13
Ma-GAI	10.32	1.65	38.41	24.90	2.97
Kind1-GAI	2.88	1.21	2.27	0.90	15.28
Kind2-GAI	2.00	4.22	0.18	0.48	14.34
Pa-MCADD	11.38	2.82	6.21	2.20	0.86
Ma-MCADD	8.00	1.98	3.16	1.04	4.72
Kind1-MCADD	59.61	3.16	45.43	20.27	49.88

Tabel 14: Die praktiese effek vir die verskillende asielkarnitienformules wat ontwerp is. Die praktiese verskil toon die verskil van die verskillende ontwerpte formules ten opsigte van mekaar aan (Figure 24, 26, 28, 30).

Pasiënte	Asielkarnitien Formules Praktiese Effek Waarde(d)			
	Formules			
	Statiene (Figuur 24)	LCAD (Figuur 26)	MCAD (Figuur 28)	GAI (Figuur 30)
Kontrole (n = 25)	2.93	1.29	0.39	1.60
Valproaat (n = 53)	8.60	1.31	1.02	1.58
Statiene (n = 4)	-	1.07	1.10	1.54
GAI (n = 8)	0.52	0.26	0.13	-
MCAD (n = 6)	0.54	0.02	-	1.58
LCAD (n = 17)	0.46	-	0.75	1.56

Tabel 15: Die praktiese effek van die asielkarnitienformules wat ontwerp is. Die praktiese verskil toon aan hoe die pasiënte met die betrokke defek verskil van normale persone van verskillende ouderdomsgroepe en geslagte (Figure 25, 27, 29 , 31).

Ouderdomsgroepe	Asielkarnitien Formules Se Praktiese Effek Waarde (d)							
	Statiene		LCAD		MCAD		GAI	
	Manlik	Vroulik	Manlik	Vroulik	Manlik	Vroulik	Manlik	Vroulik
0-2	1.694	1.938	1.190	1.248	1.096	1.089	1.593	1.601
3-6	1.374	2.128	1.243	1.324	1.098	1.103	1.596	1.599
7-10	1.397	1.700	1.111	1.179	1.064	1.085	1.585	1.587
11-15	1.266	2.088	1.227	0.854	1.101	1.088	1.601	1.593
16-25	0.771	1.089	1.197	1.172	1.090	1.032	1.590	1.590
26-35	1.312	0.915	1.201	1.238	1.091	1.095	1.601	1.590
36-50	1.128	1.076	1.122	1.003	1.098	1.091	1.593	1.597
51-65	1.431	0.593	1.053	1.096	1.088	1.086	1.590	1.589

BYLAAG D

DIEET VAN VRYWILLIGERS BETROKKE BY KARNITIENBELADINGS

Ontbyt (7:00 vm)

- 2 snye wit brood met appelkooskonfyt en kaas
- 2 koppies Kellogs Corn Flakes®
- 240mL koue volroom melk
- 2 sakkies suiker
- 240mL lemoensap
- 240mL kaffeien vrye koffie

Ligte oggend verversing (10:00 vm)

- 175mL aarbeï yoghurt
- 1 appel
- 1 piesang

Middagete (13:00 nm)

- Pasta slaai (2 koppies pasta) met ham, kaas, uie, eiers, tamatie en mayonaise

Ligte middag verversing (15:30 vm)

- Volgraan botterbroodjie

Aandete (19:00 nm)

- 1 porsie gekookte hoender
- 2 gebakte aartappels
- 1 koppie wit rys
- 1 koppie broccoli
- 2 pampoens koekies
- 2 eetlepels roomys

- 240mL kaffeien vrye koffie

Ligte laat aand verversing (21:00 nm)

- 2 skyfies kaas
- 4 'cream crackers'

Elke vrywilliger is voorsien van twee 300mL Oros™ en twee 500mL mineraalwater (1mg/L Magnesium) wat *ad libidum* geneem kon word gedurende die 24uur