

**DIE ONTWIKKELING VAN 'N TANDEM-
MASSASPEKTROMETRIESE METODE AS
BEVESTIGENDE ANALISE VIR KOOLHIDRAAT
METABOLIESE DEFEKTE**

deur

M DERCKSEN Hons BSc.

Verhandeling voorgelê as
gedeeltelike nakoming van die
vereistes vir die graad Magister
Scientiae in Biochemie

In die Fakulteit Natuurwetenskappe, Skool vir Biochemie aan die
Noord-Wes Universiteit, Potchefstroomkampus

Studieleier: Mnr E Erasmus

Medestudieleier: Prof L J Mienie

Junie 2006

Potchefstroomkampus

**THE DEVELOPMENT OF A TANDEM–MASS
SPECTROMETRIC METHOD AS A
CONFIRMATIVE ANALYSIS FOR
CARBOHYDRATE METABOLIC DEFECTS**

by

M DERCKSEN Hons BSc.

Dissertation submitted for the
Master of Science degree in
Biochemistry

In the Faculty of Natural Science,
School of Biochemistry, North-
West University, Potchefstroom
campus

Supervisor: Mr E Erasmus

Co-Supervisor: Prof L J Mienie

June 2006

Potchefstroom Campus

'n Wyse ou man het eendag gesê: *“Om koolhidrate te analiseer, is soos om klitsgras van jou kous af te trek. Daar is baie punte om aan te vat, maar nie een is sterk genoeg om die totale struktuur te verwyder nie en hoe meer krag jy insit, hoe groter is die dele wat agterbly.”* ~ Prof. L J Mienie

Inhoudsopgawe

Lys van Figure	vi
Lys van Tabele	xi
Bedankings	xiii
Lys van Afkortings	xiv
Woordelys	xvii
Opsomming	xxxiv
Abstract	xxxv

Hoofstuk 1: Inleiding en Probleemstelling	1
--	---

Hoofstuk 2: Struktuur en funksionele rol van koolhidrate in die liggaam

2.1 Inleiding.....	5
2.2 Monosakkariede.....	6
2.2.1 Struktuur.....	6
2.2.2 Chemiese eienskappe en reaksies.....	9
2.3 Biologiese belangrike monosakkariedderivate.....	12
2.3.1 Glikosiede.....	12
2.3.2 N-Glikosielamiene	14
2.3.3 Suikeralkohole.....	17
2.3.4 Suikersure.....	19
2.3.4 Suikerfosfate.....	20
2.4 Oligosakkariede en Polisakkariede.....	22
2.5 Proteoglikane.....	29

Hoofstuk 3: Koolhidraatmetabolisme en defekte van die koolhidraat metabolisme

3.1 Inleiding.....	31
3.2 Koolhidraatmetabolisme.....	32
3.2.1 Vertering.....	32
3.2.1.1 Polisakkariedvertering.....	32
3.2.1.1 Oligosakkariedvertering.....	33
3.2.2 Absorpsie en distribusie van monosakkariede.....	33
3.2.3 Metabolisme van monosakkariede.....	36
3.2.3.1 Glikolise en glukoneogenese.....	36
3.2.3.2 Galaktosemetabolisme.....	41
3.2.3.3 Fruktose-, mannose- en fukosemetabolisme.....	43
3.2.3.4 Pentosefosfaatweg.....	47
3.2.3.5 Aminosuikermetabolisme.....	50
3.2.3.5 Inositolfosfaatmetabolisme.....	54
3.2.4. Oligosakkariedmetabolisme.....	57
3.2.4.1 Glikogeenanabolisme en –katabolisme.....	58
3.2.4.2 Glikosamienglikaanmetabolisme.....	61
3.2.5 Proteoglikaanmetabolisme.....	64

Hoofstuk 4: Eksperimentele Metodes

4.1 Inleiding.....	67
4.2 Die kwalitatiewe identifikasie van koolhidrate met behulp van dunlaagchromatografie.....	68
4.2.1 Apparaat en reagense.....	69
4.2.2 Prosedure.....	69
4.2.3 Standaardisasie en toepassings van dunlaagchromatografie.....	70
4.3 Derivatisering van koolhidrate met 1-feniel-3-metiel-2,5-pirozaloon (PMP) en die analisering daarvan met behulp van elektrospoei-ionisasie en tandem-massaspektrometrie.....	72

4.3.1 Apparaat en reagentie.....	73
4.3.2 Procedure en Standardisasie van derivatiseringsmetode en analisering van koolhidrate met behulp van elektrospoei-tandem-massaspektrometrie.....	74
4.3.3 Elektrospoei-tandem-massaspektrometrie spesifikasies vir die analisering van koolhidraatderivate.....	75
4.3.4 Toepaslike uriene-analising van verskeie groepe, naamlik 'n kontrole-groep en pasiënte met aangebore metaboliese siektes.....	76
4.4 Spektrofotometriese analisering van fruktose en fruktose-bevattende koolhidrate (Triptamien-toets).....	77
4.4.1 Apparaat en reagentie.....	77
4.4.2 Procedure en standaardisasie.....	78

Hoofstuk 5: Resultate en Bespreking

5.1 Inleiding.....	79
5.2 Dunlaagchromatografie.....	81
5.2.1 Die Standardisasie en kwalitatiewe identifikasie van koolhidrate met dunlaagchromatografie.....	81
5.2.2 Identifikasie van potensiële koolhidraatafwykings met behulp van dunlaagchromatografie.....	84
5.2.2.1 Urinêre koolhidraatprofile van tradisionele metaboliese koolhidraatdefekte.....	84
5.2.2.2 Urinêre koolhidraatprofile van nie-verwante koolhidraatsiektes.....	88
5.2.3 Die invloed van medikasie op die interpretasie van die dunlaagchromatografie resultaat.....	90
5.3 MS-MS en LC-MS-MS analisering van PMP-gederivatiseerde koolhidrate	
5.3.1 Historiese agtergrond.....	94

5.3.2	Standaardisasie van die derivatiseringsmetode en massaspektrometriese kondisies.....	95
5.3.3	Standaardisasie van die ekstraksie- en analiseringsmetode van PMP-koolhidraatderivate uit uriene.....	96
5.3.3.1	Ekstraksie met en sonder soliede fase ekstraksie (C18 kolommetjies).....	96
5.3.3.2	Presisie.....	98
5.3.3.3	Die analisering van mono- en disakkariedes met behulp van LC-MS-MS.....	100
5.3.4	Die gebruik van Tandem-massaspektrometrie as addisionele siftings-prosedure van koolhidraatmetabolisme defekte.....	104
5.4	Spektrofotometriese analise van fruktose en fruktosebevattende koolhidrate (Triptamien-Fruktose toets).....	122
5.4.1	Selektiwiteit en standaardisasie van die spektrofotometriese bepaling van fruktose.....	122
5.4.2	Die bepaling van 'n gemiddelde fruktosekonsentrasie in kontrole-pasiënte.....	124
5.4.3	Die invloed van medikasie op die spektrofotometriese bepaling van fruktose.....	126
5.4.4	Urinêre fruktosebepaling van pasiënte met 'n definitiewe fruktose metaboliese defek.....	129
5.5	Samevatting.....	130
Hoofstuk 6:	Gevolgtrekking.....	131
6.1	Voorgestelde areas van verbetering	133
6.2	Voorstelle vir toekomstige navorsing:.....	133
Bronnelys.....		136

Lys van Figure:

- Figuur 2.2.1.1:** Monosakkariede van die triose groep
- Figuur 2.2.1.2:** Fischer projeksies van die mees algemene aldoses wat in biologiese materiaal voorkom
- Figuur 2.2.1.3:** Fischer projeksies van die mees algemene ketoses wat in biologiese materiaal voorkom
- Figuur 2.2.1.4:** Konvensies vir die strukturele voorstelling van koolhidrate
- Figuur 2.2.2.1:** Skematiese voorstelling van algemene chemiese reaksies wat koolhidrate kan ondergaan
- Figuur 2.2.2.2:** Die toets en identifikasie van koolhidrate met behulp van hul chemiese eienskappe
- Figuur 2.3.1.1** Voorstelling van die reaksies by die vorming van glikosiede tydens detoksifisering
- Figuur 2.3.2.1:** Voorstelling van die struktuur van aminosuiker wat in die metabolisme aangetref word
- Figuur 2.3.2.2:** Chemiese struktuur van die belangrikste verteenwoordigers van die siaalsuur familie, Neu5Ac en die mees algemene modifikasies
- Figuur 2.3.3.1:** Die struktuur en formasie van suikeralkohole
- Figuur 2.3.4.1:** Strukture van bekende suikersure
- Figuur 2.3.5.1:** A) Struktuur van ATP, B) struktuur van D-Fruktose-1,6-bifosfaat, C) struktuur van Glukose-6-fosfaat, D) struktuur van Ribose-5-fosfaat
- Figuur 2.4.1:** 'n Skematiese voorstelling van die 2 verskillende stereo-isovorme wat in oligo- en polisakkariede voorkom
- Figuur 2.4.2:** 'n Skematiese voorstelling van verskeie glikosidiese bande wat tussen monosakkaried eenhede in die oligosakkariede en polisakkariede voorkom

- Figuur 2.4.3:** Struktuur en voorkoms van disakkariede
- Figuur 2.4.4:** Skematiese Voorstelling van die: A) basiese struktuur van stysel ($n < 10$) wat bestaan uit amilose en B) struktuur van amilopektien
- Figuur 2.4.5:** 'n Skematiese voorstelling van die struktuur van glikogeen
- Figuur 2.4.6:** Verskeie glikosamienglikaan strukture
- Figuur 2.5.1:** A) Die struktuur van O-gekoppelde oligosakkaried, B) N-gekoppelde oligosakkaried
- Figuur 2.5.2:** Skematiese voorstelling van die verskeie vertakte strukture van N-gekoppelde oligosakkariede
- Figuur 3.2.3.1.1:** Voorstelling van die reaksie van die glikolise- en glukoneogenese-weg.
- Figuur 3.2.3.2.1:** Voorstelling van die galaktosemetabolisme
- Figuur 3.2.3.3.1:** Fruktose-, mannose- en fukosemetabolisme
- Figuur 3.2.3.4.1:** Skematiese voorstelling van die reaksie in die pentosefosfaatweg
- Figuur 3.2.3.5.1:** Voorstelling van die metabolisme betrokke by die aminosuiker-metabolisme
- Figuur 3.2.3.6.1:** Skematiese voorstelling van die inositolfosfaatmetabolisme
- Figuur 3.2.4.1.1:** Skematiese voorstelling van die biosintese van glikogeen
- Figuur 3.2.4.1.2:** Skematiese voorstelling van die katabolisme van glikogeen in die lewer en spiere
- Figuur 3.2.4.2.1:** Skematiese voorstelling van die glikosamienglikaanafbraak
- Figuur 3.2.5.1:** Die skematiese voorstelling van die N-gekoppelde oligosakkaried degradasie
- Figuur 4.3.1:** Die derivatisering van aldose suikers met behulp van PMP
- Figuur 4.4.1:** Ketosuikers wat met triptamienreagens reageer
- Figuur 5.2.1.1:** Koolhidraat standaardreeks Die chromatogram is slegs ter illustrasie van die konsentrasieverskille op die chromatogram

- Figuur 5.2.2.1.1:** Koolhidraatprofiel van bekende metaboliese defekte 1 en 2) glikogeenstoringsiektes; 3) Standaard; 4 en 5) Galaktosemie a en Galaktosemie b
- Figuur 5.2.2.1.2:** Koolhidraatprofiel van bekende metaboliese defekte 1) Fruktosurie; 2) Fruktose 1-6-bifosfaat defek; 3) Standaard; 4 en 5) Glikosileringsdefekte
- Figuur 5.2.2.1.3:** Koolhidraatprofiel van bekende metaboliese defekte 1) Pentosurie; 2) Kontrole pasiënt 3) Standaard; 4) Diabeet en 5) Laktose intoleransie
- Figuur 5.2.2.1.4:** Lisosomale storingsiektes. A) 1) GM1-Gangliosidase defek; 2) Fukosidose defek ; 3) Standaard; 4) α -Mannosidose defek; 5) β -Mannosidose defek. B) 1) Kontrolemonster (geen koolhidraatdefek); 2) Standaard; 3) Fukosidose defek.
- Figuur 5.2.2.2.1:** Koolhidraatprofiel van pasiënte met simptome van Parkinsonisme (Bane 1,4,5,6,7,9 en baan 10: Pasiënte met parkinsonisme; baan 2: kontrolepasiënt; bane 3 en 8 : standarde.)
- Figuur 5.2.2.2.2:** ADHD-pasiënte se koolhidraatprofiel. 'n Duidelike koolhidraat abnormaliteit bestaan. Sukrose en glukose is in elke ADHD-pasiënt se urienmonster teenwoordig; (Bane 1,2,4,5,7,9 en 10: ADHD-pasiënte; baan 6: kontrolepasiënt; bane 3 en 8: standarde.)
- Figuur 5.2.3.2:** Metabolisering en detoksifisering van Parasetamol in die menslike liggaam.
- Figuur 5.2.3.2:** Metabolisering en detoksifisering van Valproaat in die menslike liggaam

Figuur 5.2.3.3: Die invloed van medikasie op dunlaagchromatografie van koolhidrate. Bane 1, 4 en 5: pasiënte wat valproaat inneem; bane 2 & 9: kontrolepasiënt; bane 3 & 8: standaardoplossing; Bane 6, 7 en 10: pasiënte wat Parasetamol inneem.

Figuur 5.3.3.1.1: Ekstraksie van oligosakkariedes met geen soliede fase ekstraksiestap

Figuur 5.3.3.1.2 Ekstraksie met behulp van die soliede fase ekstraksiestap

Figuur 5.3.3.2.1: Grafiese voorstelling van die interne-inspuit presisie.

Figuur 5.3.3.2.2: Grafiese voorstelling van die internegroep presisie

Figuur 5.3.3.3.1: Chromatografiese skeiding van mono- en disakkariedderivate met behulp van LC-MS-MS

Figuur 5.3.3.3.2: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van pentose suikers : xilose en ribose

Figuur 5.3.3.3.2: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van disakkariede: laktose en maltose

Figuur 5.3.3.3.2: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van monosakkariede (aldoses): galaktose, glukose en mannose

Figuur 5.3.3.3.2: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van die interne standaard: L-Rhamnose

Figuur 5.3.4.1: Kontrolepasiënt – geen koolhidraatafwyking is bevestig. A) MS-MS skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding

Figuur 5.3.4.2: Pentosurie koolhidraat-profiel. A) Tandem-MS Skandering; B) Bevestigende LC-MS-MS analise.

Figuur 5.3.4.3:Klassieke galaktosemie: A) MS-MS skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding.

Figuur 5.3.4.4: Nie-klassieke galaktosemie. A) MS-MS skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding

- Figuur 5.3.4.5:** Laktose intoleransie: A) MS-MS skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding
- Figuur 5.3.4.6:** Glikogeenstoringsiekte tipe 3 (de-vertakkingsdefek): MS-MS-skanderingsprofiel.
- Figuur 5.3.4.7:** MS-MS skanderingsprofiel van 'n α -Mannosidose pasiënt
- Figuur 5.3.4.8:** MS-MS skanderingsprofiel van 'n β -Mannosidose pasiënt.
- Figuur 5.3.4.9:** GM1-gangliosidose: MS-MS-skanderingsprofiel (GlcNAc = N-asetielglukosamien en H = mannose/glukose/galaktose)
- Figuur 5.3.4.10:** MS-MS skanderingsprofiel van 'n Fukosidose pasiënt
- Figuur 5.3.4.11:** Die gebruik van 'n kontrolegroep om normale koolhidraatprofiel te identifiseer
- Figuur 5.3.4.12:** Grafiese voorstelling van die gesamentlike resultate van paragraaf 5.3.5.
- Figuur 5.4.1.1:** Standaardisering van die triptamien-fruktose bepaling
- Figuur 5.4.2.1** Normaalverspreiding van die abnormale en normale fruktose konsentrasies
- Figuur 5.4.3.1:** Die invloed van die Parasetamolmetaboliete op die spektrofotometriese bepaling van urinêre fruktose
- Figuur 5.4.3.2:** Die invloed van die Valproaatmetaboliete op die spektrofotometriese bepaling van urinêre fruktose
- Figuur 5.4.4.1:** Grafiese voorstelling van die gemiddelde fruktosekonsentrasie \pm S.D. van pasiënte met bevestigde defekte in die fruktosekatabolisme
- Figuur 6.2.1:** Skematiese voorstelling vir die siftingsprosedure wat tans in die roetinelaboratorium gebruik word.
- Figuur 6.2.2:** Skematiese voorstelling vir die siftingsprosedure wat in die toekoms in die roetinelaboratorium gebruik sal word.

Lys van Tabele

Tabel 2.4.1: Vernaamste koolhidraatverbindings en hul betrokke glikosidiese-bindings

Tabel 2.4.2: Belangrike glikosamienglikane in die menslike liggaam

Tabel 3.2.1.1.1: Ensieme betrokke by die vertering van koolhidrate

Tabel 3.2.2.1: Transportproteïene betrokke by die absorpsie en distribusie van koolhidrate

Tabel 3.2.2.2: Aangebore defekte van die monosakkariedtransporters

Tabel 3.2.2.3: Abnormale koolhidrate by defekte van die transportproteïene

Tabel 3.2.3.1.1: Glikoliseweg ensieme, isosieme en bekende defekte

Tabel 3.2.3.2.1: Ensieme, isosieme en defekte van die galaktose katabolisme

Tabel 3.2.3.3.1: Ensieme, isosieme en defekte van die fruktose-, mannose- en fukose- metabolisme

Tabel 3.2.3.4.1: Ensieme, isosieme en defekte van die pentosefosfaatweg

Tabel 3.2.3.5.1: Ensieme, isosieme en defekte van die aminosuikermetabolisme

Tabel 3.2.3.6.1: Ensieme, isosieme en defekte van die inositolfosfaatmetabolisme

Tabel 3.2.4.1.1: Verskeie glikogeenstoringsiektes en hul ensiemdefekte

Tabel 3.2.4.2.1: Ensieme, isosieme en defekte van die glikosamienglikaan-metabolisme

Tabel 3.2.5.1: Ensieme, isosieme en bekende defekte van die N-gekoppelde oligosakkaried degradasie

Tabel 4.2.1.1: Apparaat en reagense benodig vir dunlaagchromatografie

Tabel 4.2.2.1: Inligting vir die bepaling van die analitiese volume

Tabel 4.3.1.1: Apparaat en reagense benodig vir die PMP-koolhidraatderivaat analisering

Tabel 4.4.1.1: Apparaat en reagense benodig vir triptamien-fruktosebepaling

Tabel 5.2.1.1: Die eksperimentele Rf-waardes en hul standaardafwyking sowel as die vertoonde kleur van die onderskeie suikers op die dunlaagchromatogram

Tabel 5.2.2.1.1: Die gebruik van die Rf-waarde vir koolhidraat identifikasie

Tabel 5.2.3.1: Rf-Waardes van medikasiemetaboliete

Tabel 5.3.2.1: Die dogter- en moederione (pseudo-molekulêre ione) van die onderskeie koolhidraat-PMP-derivate

Table 5.3.4.1: Belangrike metabolietmerkers wat in die urine van pasiënte met lisosomale storingsiektes voorkom.

Tabel 5.4.1.1: Die triptamien-fruktose bepaling op 'n reeks koolhidrate en koolhidraat-fosfate

Tabel 5.4.2.1: 'n Opsomming van die statistiese waardes van die normaalverspreiding van die twee betrokke groepe pasiënte

Bedankings

Daar is geen woorde om almal te dank vir hul ondersteuning, hulp en motivering tydens die studie nie. Ek wil die volgende mense in besonder bedank:

- My man, Tiaan, vir sy liefde, bystand en geduld.
- Vir die res van my familie, en in besonder my ma's en pa's vir finansiële en emosionele ondersteuning.
- My studieleiers, Prof. L J Mienie en Mnr E. Erasmus, wat altyd bereidwillig was om hul geduld, leiding en motivering te verskaf.
- Finansiële ondersteuning deur die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte te Potchefstroom (Noordwes-Universiteit, Departement Biochemie).
- Die personeel by die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte te Potchefstroom, in besonder:
 - Ansie, vir haar spesiale vriendskap sowel as die taalversorging wat sy so noukeurig gedoen het.
 - Brenda, vir haar motivering sowel as die deel van haar kennis ten opsigte van die metabolisme van koolhidrate.
 - Lynette en Linda vir die tegniese hulp wat hulle altyd bereid was om te verleen.
 - Carina sowel as Prof H Kotze vir hulle hulp in die statistiese verwerking van die data en praktiese uitleg van die studie.

Bo alles dank ek my Hemelse Vader vir die verstandelike vermoëns en daaglikse krag wat hy my gegee het om die studie te voltooi.

Lys van Afkortings

Ac₂O₂: Aktiniumoksied

ADHD: Attention-deficit/hyperactivity disorder / Aandagspantekort hiperaktiwiteit-sindroom.

ADP: Adenosiendifosfaat

AMP: Adenosienmonofosfaat

Asn: Asparagien

Ag₂O: Silweroksied

ATP: Adenosientrifosfaat

BaSO₄: Bariumsulfaat

Br₂: Bromied

(CH₃CO)₂O: Asynsuuranhidried

CH₃I: Metieljodied

CDG: Koolhidraat-defektiewe glikoproteien

CE: Kappilêre elektroforese

cm: Sentimeter

C18: Stationêre fase wat betaan uit koolstofketting met die lengte van 18 koolstofatome

C°: Grade celcius

DHAP: Dihidroksieasetoonfosfaat

DNA: Dioksieribonukliënsuur

E.C.: "Enzyme classification" of ensiemklassifikasie

ESI-MS-MS: Elektronsproei ionisasie tandem-massaspektrometrie

F of P: Fosfaat

FAB: "Fast atom bombardment"

Fuc: Fukose-residue

GAG: Glikoaminoglikane

Gal: Galaktose-residue
GalNAc: N-Asetielgalaktosamien
GALE-defek: galaktose epimerase defek
GALK-defek: galaktosekinase-defek
Gal-1-P: Galaktose-1-fosfaat
GAP: Gliseraldehyd-3-Fosfaat
GC: Gaschromatografie
GC-MS: Gaschromatografie-Massaspektrometrie
GlcNAc: N-asetielglukosamien
GLUT: Glukose transporter
GSD: Glikogeenstoringsiekte
HCl: Soutsuur
HCN: Waterstofsianied
HIO₄: Waterstofperjodaat
H₂O: Water
HPLC: Hoë-verrigtingsvloeistofchromatografie of hoë drukvloeistof-chromatografie
HNO: Salpetersuur
H₂NOH: Hidroksielamien
H₂SO₄: Swawelsuur
IMP: Inosienmonofosfaat
IS: Interne standaard
KDN: Deaminoneuramiensuur
LC-MS-MS: Vloeistofchromatografie Tandem-massaspektrometrie
Man: Mannose-residue
Maldi-Tof: Matrix-Associated Laser Desorption Ionization Time of Flight
μmol: Mikromolar
ml: Milliliter
Mm: Millimolar

mmol/l: Millimol per liter
MPS: Mukopolisakkaridose
MS: Massaspektrometrie
MS-MS: Tandem Massaspektrometrie
m/z: "mass-to-charge ratio" of massa tot lading verhouding
NAD: Geoksideerde vorm van nikotienamied-adenosien-dinukleotiede
NADH: Gereduseerde vorm van nikotienamied-adenosien-dinukleotiede
NADPH: Gereduseerde vorm van nikotienamied-adeniendinukleotiedfosfaat
NaOCH₃: Natriummetilaat
NaOH: Natriumhidroksied
NaBH₄: Natriumborohidraat
Neu5Ac: N-asetielneuramiensuur
Neu5Gc: N-glikolielneuramiensuur
NH₃: Ammoniak
PAGE: Poliakrielamied-gelelektroforese
Pd: Lood
pH: Log van die waterstofioonkonsentrasie
PMP: 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolone
PKU: Phenielketonurie
pmol: pikomolar
RNA: Ribonukliënsuur
UDP: Uridiendifosfaat
UTP: Uridientrifosfaat
UV: Ultra-violet
SA: Siaalsuur-residue of N-asetielneuramiensuur residue
SGLUT: Natrium-afhanklike glukose transporter
S.D.: Standaardafwyking
Ser: Serien-residue

SPE: Solide fase ekstraksie / Solid phase extraction

TLC: Dunlaagchromatografie / Thin layer chromatography

Thr: treonien-residue

Vol: Volume

Woordelys

Aandagspantekort hiperaktiwiteitsindroom: 'n Psigologiese afwyking wat voorkom by kinders ouer as 7 jaar en wat gepaard gaan met verkorte of geen aandagspan, impulsiwiteit en hiperaktiwiteit

Alkaptonurie: 'n Rare metaboliese defek wat resulteer as gevolg van die onvolkome metabolisering van tirosien. Homogentesiensuur akkumuleer in die liggaam en hoë hoeveelhede word deur die uriene uitgeskei (uriene verkleur donker). Geen lewensgevaarlike simptome is teenwoordig nie, hoewel okronose ('n tipe artritis) later ontwikkel word.

Alzheimer se siekte: Progressiewe neurologiese agteruitgaan wat gekarakteriseer word aan geheueverlies, rusteloosheid, disoriëntasie, agnosia, spraakprobleme, onvermoë om willekeurige bewegings uit te voer en hallusinasies. Die siekte begin gewoonlik in die pasiënt se vyftiger jare maar vererger dramaties na die ouderdom van sewentig.

Amilase: Dit is die ensiem wat die hidrolise van stysel na kleiner subeenhede kataliseer. Verskeie soorte kom in die liggaam voor, naamlik, pankreasamilase, speekselamilase en glikoamilase (Ook α -amilase genoem).

Amilopektien: Styselverbinding wat meer vertak voorkom. Die verbinding is dus 'n onoplosbare polisakkaried met 'n hoë molekulere massa.

Aminosuururie: Akkumulاسie van aminosure in die uriene as gevolg van 'n primêre of sekondêre effek op die aminosuurmetabolisme. Gaan gewoonlik gepaard met lewerskade.

Arteriosklerose: 'n Algemene afwyking gekenmerk deur die verdikking, verlies van elastisiteit en die kalsifisering van arteriële wande. Die afwyking resulteer in oneffektiewe bloedvloei deur die liggaam. Die toestand kan saam met verskeie siektes voorkom, soos hiperlipidemie en hipertensie.

α -Mannosidose tipe I en II: Lisosomale storingsiekte waar 'n defektiewe α -mannosidose ensiem voorkom. Die defek resulteer in die defektiewe afbraak van mannosebevattende oligosakkariede. Die oligosakkariede akkumuleer in die liggaam en word deur die uriene uitgeskei. Tipe 1 resulteer in vestandelike vertraging, lewervergroting en disostose multipleks. Tipe 2 is minder ernstig en kom onder volwassenes voor.

Aspartielglukosamienurie: Die defek is outosomaal resessief en veroorsaak hoofsaaklik ontwikkelingsvertraging. Defektiewe aspartielglukosaminidase resulteer in die akkumulاسie van N-aspartielglukosamien en verwante metaboliete. Simptome is waarneembaar vanaf twee tot vier jaar. Spraak word aangetas, respiratoriese disfunksie kom voor, osteoporose en epileptiese aanvalle kom voor.

Antibiotika: 'n Antimikrobiese middel, byvoorbeeld penisillien, wat sinteties of deur middel van mikrobes (fungus of bakterieë) geproduseer kan word. Die middels word gebruik om infeksies te behandel.

Bilirubien: Die oranje, geel pigment van gal, wat gevorm word deur die afbraak van heem afkomstig van hemoglobien in rooibloedselle.

β -mannosidose: Die siekte resulteer as gevolg van 'n defektiewe β -mannosidase ensiem. Die defek lewer die uitskeiding en storing van Mannose-(β -1-4)-N-

asetielglukosamien. Die afwyking is ernstig en epileptiese aanvalle, angiokeratoma corporis diffusum, verstandelike gestremdheid, respiratoriese disfunksie en spraakabnormaliteite kom voor.

Derivatiseer: Die chemiese verandering van 'n bestaande verbinding om 'n unieke derivaat te vorm. Die derivaat kan dan gebruik word om die betrokke verbinding se bestaan te bevestig.

Dent se siekte: Die siekte is 'n familieel proksimale renale tubilêre afwyking wat geassosieer word met proteïenurie, hiperkalsiumurie, nefrokalsinosis en nierstene. Die defek is 'n X-gekoppelde afwyking.

Diabetes mellitus: 'n Komplekse afwyking van die koolhidraat-, vet- en proteïenmetabolisme as gevolg van die verlies of tekort aan insuliensekresie deur die beta-selle van die pankreas of weerstand tot insulien. Die siekte is gewoonlik familieel.

Diabetiese neuropatie: 'n Nie-inflammatoriese proses wat geassosieer word met diabetes mellitus en gekarakteriseer word deur sensoriese en / of die motoriese versteurings in die perifere senuweesisteem.

Diabetiese nefropatie: 'n Inflammatoriese, degeneratiewe en sklerotiese proses van die niere wat geassosieer word met diabetes mellitus.

Elektronspoei-ionisasie (ESI): Dit is 'n tegniek wat gebruik word in massaspektrometrie om toepaslike ione met behulp van sagte ionisasie te produseer (van byvoorbeeld makromolekules).

Fanconi-Bickel sindroom: Fanconi-Bickel sindroom is 'n rare oorerflike siekte van die koolhidraatmetabolisme, wat veroorsaak word deur 'n mutasie in die geen wat oorsprong lewer aan GLUT 2-transporter.

“Fast atom bombardment” (FAB): 'n Metode waar ione geproduseer word van nie-vlugtige of termiese onstabiele organiese molekules in 'n massaspektrometer. Die proses geskied deur die bombardering van die verbinding in 'n gekondenseerde fase met energierike neutrale partikels

Fenotipe: Die waarneembare karakteristieke eienskappe van 'n organisme of groep organismes. Die eienskappe sluit anatomiese-, fisiologiese- en biochemiese eienskappe in. Die eienskappe word deur genetiese sowel as eksterne faktore beïnvloed.

Fruktosurie: Die verhoogde voorkoms van fruktose in die uriene van 'n pasiënt.

Fukosidose: Die afwyking is 'n defek in die fukosidase ensiem wat 'n hidrolasereaksie uitvoer tydens N-glikaan degradasie. Twee tipes is geïdentifiseer, waarvan die eerste ernstiger is. Pasiënte toon verstandelike gestremdheid, groeivertraging, disostose multipleks en verhoogde sweetuitskeiding. Die defek resulteer nie net in glikoproteïen akkumulاسie nie, maar ook in glikolipied akkumulاسie. Al twee die verbindings bevat fukosidose-residue.

Gaschromatografie: Dit is die proses waarin 'n mengsel van analiete (vlugtig van aard) geskei word op grond van hul struktuur, met behulp van 'n geskikte mobiele fase, naamlik 'n gas (byvoorbeeld helium) sowel as 'n geskikte temperatuurprogram en deteksieproses (byvoorbeeld: FID of MS).

Gastroënterietes: Inflammasie van die slymvliese van die intestinum wat gepaard gaan met ander gastro-intestinale afwykings. Simptome hiervan is naarheid, vomering, anoreksie, koors en diaree.

Glikoegenstoringsiekte: Dit is 'n groep aangebore metaboliese siektes wat resulteer in die afwyking van die glikoegenmetabolisme. 'n Ensiemdefek in die weg resulteer in die abnormale akkumulاسie van glikoegen in verskillende dele van die liggaam – byvoorbeeld die lewer.

Glikoneogenese: Die formasie van glikoegen vanuit vetsure en proteïene eerder as vanuit glukose. Die proses geskied in die lewer.

Glikosfingolipiede: Dit is die verbinding wat vorm tussen 'n koolhidraat en 'n seramied. Laasgenoemde is 'n vetagtige verbinding wat gevind word in die sentrale senuweestelsel.

Glikoaminoglikane: (Ook as GAG's afgekort) Dit is liniêre polisakkaried kettings wat uit herhalings van gemodifiseerde disakkariede bestaan (10-20,000 disakkariedes per GAG). GAG's maak ook 'n groot deel uit van proteoglikane en die rol van glikoaminoglikane is afhanklik van sy strukturele eienskappe. Die GAG mag sulfaatgroepe besit soos heparansulfaat of geen sulfaat groep besit soos hialoronaat. Ook mukopolisakkariede genoem.

G_{M1}-gangliosidose: 'n Outosomale resessiewe lisosomale storingsiekte wat gekarakteriseer word deur die akkumulاسie van G_{M1} gangliosiede, oligosakkariede, mukopolisakkaried - keratansulfate (en hul derivate). 'n Defek in 'n lisosomale hidrolase reaksie, naamlik β -galaktosidase, veroorsaak G_{M1} gangliosidosis en

Morquio se siekte tipe B. Drie kliniese subtipes bestaan – hulle word geklassifiseer op grond van ouderdom wanneer simptome voorkom.

G_{M2}-gangliosidose: Die G_{M2} gangliosidose is 'n groep lisosomale storingsiektes wat hoofsaaklik as gevolg van mutasies in die gene van heksosaminidase A en B voorkom. Defektiewe ensieme resulteer in die akkumulering van substrate in die neurale lisosome wat lei tot seldood. Dié groep kan in 2 siektes geklassifiseer word, naamlik: Tay-Sachs se siekte waar die heksosaminidase A gewoonlik defektief is en Sandhoff se siekte en sy variante wat hoofsaaklik as gevolg van 'n defektiewe heksosaminidase A en B.

Galaktosemie: 'n Oorerflik outosomale resessiewe defek van die galaktose metabolisme. Dit word meestal gekarakteriseer aan 'n defektiewe uridieltransferase ensiem. Verhoogde galaktose in die bloed sowel as in die urine is waarneembaar.

Hiperglisemie: Die voorkoms van abnormale verhoogde vlakke van glukose in die bloed. Die toestand kom voor by diabetiese pasiënte sowel as pasiënte met genetiese afwykings.

Hemolitiese anemie: Dit is 'n afwyking wat gekenmerk word aan die kroniese, premature destruksie van rooibloedselle. Die kondisie mag voorkom by sekere infektiewe siektes sowel as 'n wye reeks genetiese defekte

Hepatomegalie: Abnormale vergroting van die lewer wat geassosieer word met verskeie siektes.

Hoë-druk vloeistofchromatografie of hoë-verigtingsvloeistofchromatografie: Die tegniek is 'n vorm van vloeistofchromatografie wat gebruik word in die skeiding van verbindinge om 'n oplossing te bewerkstellig. Daar word dus van 'n HPLC-

instrument gebruik gemaak ,wat bestaan uit die mobiele fase, pomp, kolom (stationêre fase) en detektor (byvoorbeeld MS-MS of UV-detektor) om die skeidingsproses te fasiliteer. Die verbindings in die oplossing skei ten opsigte van hul chemiese eienskappe.

Hematurie : Die abnormale teenwoordigheid van bloed in die uriene.

Huntington se siekte: 'n Rare abnormale oorerflike kondisie wat gekarakteriseer word deur kroniese progressiewe chorea sowel as verstandelike agteruitgang wat resulteer in hallusinasies.

Hurler-sindroom: Dié afwyking is outosomaal-resessief en word ook mukopolisakkaridose I genoem. Die afwyking resulteer in algehele verstandelik gestremdheid sowel as multisitemiese abnormaliteite, naamlik: visieprobleme, disostose multipleks, organomegalie en hartsiektes.

Hurler-Sheie sindroom: Die siekte is geneties dieselfde as die Hurler –sindroom, maar milder simptome is waarneembaar by die pasiënte.

Hunter-sindroom: Die afwyking is outosomaal-resessief en word ook mukopolisakkaridose II genoem. Die afwyking resulteer in minder verstandelike gestremdheid sowel as multisitemiese abnormaliteite, naamlik kort statur en kipfose. Die defek kom slegs by manlike pasiënte voor.

Laktiese asidose: 'n Abnormaliteit wat gekarakteriseer word deur die akkumulering van laktaat in die bloed, wat resulteer in verlaging van pH in die serum en spiere.

Ioonuitruilingschromatografie: Die vorm van chromatografie geskied op die beginsel van aantrekking tussen molekules wat 'n teenoorgestelde lading het.. Die feit dat sommige verbindings positief of negatief gelaai is, kan gebruik word om skeiding te fassiliteer deur die korrekte mobiele en stationêre fase te selekteer.

Ketoties: Die akkumulاسie van ketoonliggame in die liggaam as gevolg van die oormaat afbraak van vetsure. Die proses geskied as gevolg van 'n defektiewe koolhidraatmetabolisme wat resulteer in oneffektiewe energieproduksie.

Koolhidraat defektiewe-glikoproteïne: (CDG of ook kongenitale defek in glikosilasie genoem). Die defekte affekteer die brein sowel as ander dele van die liggaam. Die primêre defekte lê in die N-glikosilasie weg in die sitoplasma en endoplasmiese retikulum. Byvoorbeeld 'n defektiewe fosfomannomutase 2 (mannose-prosesseringsensiem) veroorsaak CDG tipe I.

Katarakte: Abnormale progressiewe kondisie van die lens van die oog wat gekarakteriseer word deur die verlies van deursigtigheid. 'n Grys-wit massa is waarneembaar agter die pupil.

Kongenitaal: Teenwoordig by geboorte as 'n kongenitale defek.

Korneale distrofie: 'n Oorerflike toestand waar die deurskynbaarheid van die kornea tot niet gaan. Simptome sluit defektiewe visie, ligsensitiwiteit, oogpyn en ongerief in die oog in.

Laktiese asidose: 'n Abnormaliteit wat gekarakteriseer word deur die akkumulاسie van laktaat in die bloed, wat resulteer in verlaging van pH in die serum en spiere.

Lisosomale storingsdefekte: Lisosomale defekte is aangebore metaboliese afwykings wat die degradasie ensieme van komplekse koolhidraatgroepe in die lisosome beskryf. Die defekte lei tot die storing en ekskresie van abnormale lisosomale produkte. Dit resulteer gevolglik in 'n wye reeks matige tot ernstige simptome.

Lowe se sindroom: 'n Geslagsgekoppelde toestand in mans wat gekarakteriseer word deur progressiewe vestandelige agteruitgang, renale disfunksie en kortikale katarakte met of sonder glaukoma.

Maroteaux-Lamy sindroom: Die afwyking is outosomaal-resessief en word ook mukopolisakkaridose VI genoem en resulteer in die urinêre uitskeiding van dermatansulfaat. Die afwyking resulteer in simptome wat ooreenstem met dié van Hurler-sindroom en wissel van mild tot ernstig.

“Matrix assisted laser desorption/ionization” (MALDI): Die tegniek is 'n sagter ionisasie proses wat gebruik word in massaspektrometrie om biomolekules soos proteïne en suikers te ioniseer. Die tegniek stem baie ooreen met elektronsproei ionisasie, maar in die proses word ionisasie met behulp van 'n laserstraal (gewoonlik stikstof) bewerkstellig. 'n Matriks beskerm die biomolekules wat geanaliseer word teen vernietiging deur die laserstraal.

Morquio-sindroom: 'n Familiele vorm van mukopolisakkaridose wat resulteer in abnormale spier- en skelatale ontwikkeling sowel as visieprobleme. Die defek staan ook bekend as MPS IV A en B.

Metaboliese asidose: Asidose dui op 'n oormaat suur in die liggaamsvloeistowwe en word gekenmerk aan die verlies van bikarbonate. Die toestand geskied wanneer

die pH van die bloed onder 7.35 daal. Die proses geskied gewoonlik tydens vastende toestande of oksidasie tydens anaerobiese kondisies.

Miopatie: 'n Abnormale kondisie van die skeletspiere wat gekarakteriseer word deur spierswakheid en histologiese veranderinge van die spierweefsel. Waarneembaar by spierdistrofieë.

Nie-sferiese hemolitiese anemie: 'n Groep bloedafwykings wat voorkom by gemeenskaplike aangebore metaboliese siektes van die glikolieseweg in die rooibloedselle. Almal word geassosieer met hemolise.

Isoelektriese fokusering: Die metode word gebruik om proteïene of proteïen-bevattende verbindings op grond van hul suur en basis residue te skei.

Mioglobienurie: Die teenwoordigheid van 'n oormaat mioglobien in die uriene. Mioglobilien is 'n suurstofbergingspigment in spierweefsel. Die kondisie geskied gewoonlik tydens spierskade, fisiese trauma en elektriteitsbeserings.

Methemoglobienemie: Methemoglobien kom voor wanneer die yster in die hemoglobien geoksideer is en dus glad nie aan suurstof kan koppel nie. Die verhoogde teenwoordigheid van methemoglobien in die bloed word methemoglobienemie genoem.

Mukopolisakkaridose: 'n Groep defekte, waar degradasie van mukopolisakkariede foutief is en dus resulteer in die akkumulering van die betrokke verbindings, in die weefsel en liggaamsvloeistowwe van die mens voorkom.

Renale glukosurie: 'n Familiële kondisie wat gekarakteriseer word aan 'n laer renale vatbaarheid vir glukose – dus mag die bloedglukose normaal wees, maar die glukosevlakke in die uriene abnormaal.

Rf-Waarde: Dit is die verhoudingswaarde van die afstand wat 'n analiet op die chromatogram beweeg het teenoor die afstand van beweging van die mobiele fase.

Suikeralkohole: Die karbonielgroep van monosakkariede kan chemies of ensiematies gereduseer word om die korresponderende suikeralkohol te vorm. Hoewel suikeralkohole, met die uitsondering van gliserol en inositol, nie 'n groot rol in die liggaam speel nie, kom hulle dikwels by defekte van die koolhidraatmetabolisme soos galaktosomie en diabetes voor.

Spinale spieratrofie: 'n Abnormale kongenitale toestand wat gekarakteriseer word deur die progressiewe simmetriese agteruitgang van spiere in die bene, rug en pelvis (ook Duchenne se spierdistrofie genoem).

Sialidose: Kom voor wanneer 'n defektiewe α -neuraminidase ensiem teenwoordig is. Twee duidelike fenotipes word waargeneem. Tipe 2 is ernstig en gaan gepaard met verstandelike gestremdheid en dismostose multipleks. Tipe 2 is minder ernstig, met kenmerkende rooi kolletjies in die oë, epileptiese aanvalle en ataksie.

Sanfillipo-sindroom: Vier heterogeniese tipes kom voor. Die siekte is 'n mukopolisakkaridose wat resulteer in die akkumulاسie en ekskresie van heparansulfaat. Die kliniese beeld kan beskryf word as vinnige verstandelike agteruitgang en relatiewe milde somatiese simptome. Die groep word ook geklassifiseer as mukopolisakkaridose tipe III.

Soliede fase ekstraksie: Dit is 'n proses wat gebruik word om onsuiverhede te elimineer vanuit die oplossing wat geaniliseer word. Die proses word uitgevoer deur van die analiet se affiniteit vir 'n sekere soliede materiaal gebruik te maak. Die oplossing kan sodoende met analiete gefiltreer word om die toepaslike oplossing te suiwer.

Shapiro-Wilk W toets: Die toets word gebruik om 'n aanduiding van normaliteit te lewer.

Siaalsuururie: Die verhoogde voorkoms van siaalsuur in die uriene van 'n pasiënt.

Sandhoff se siekte: Die siekte is ook bekend as 'n tipe II G_{M2} gangliosidose en resulteer as gevolg van defektiewe heksosaminidase A en B. Die siekte is 'n meer progressiewe afwyking as dié van Tay-Sachs se siekte.

Spektrofotometrie: Die bepaling van stuktuur of hoeveelheid deur die meting van verbindings se kapasiteit om lig te absorbeer by verkeie golflengtes.

Tay-Sachs se siekte (ook genoem G_{M2} gangliosidose): 'n Oorerflike neurodegeneratiewe afwyking van die lipiedmetabolisme as gevolg van 'n defektiewe heksosaminidase A. Die siekte resulteer in die akkumulاسie van spingolioiede in die brein. Verskeie tipes kom voor, naamlik tipe I G_{M2} gangliosidosis en tipe III is die mees algemene tipes.

Tiroied karsinoom: 'n Kwaadaardige epiteale neoplasma van die tiroiedklier.

Transsellulêr en parasellulêr: Eersgenoemde is die beweging van nutriente oor epiteelselmembrane na die bloed. Die proses kan met verskeie transportsisteme

geskied, byvoorbeeld gefasiliteerde diffusie en primêre- en sekondêre aktiewe transport. Parasellulêre transport is die beweging van nutriente tussen die epiteelselle deur. Die proses geskied deur normale diffusie van hoë na lae nutriëntkonsentrasies.

Wernicke-Korsakoff sindroom: Die sindroom lei tot geheueverlies sowel as die onvermoë om feite aan te leer. Die siekte is waarneembaar by kroniese alkoholiste. Die persoon is gewoonlik gedisoriënteerd en hallusineer. Die sindroom is as gevolg van 'n tekort aan tiamien wat deel is van die vitamien B kompleks.

Zenobiotika: Chemiese substansie wat vreemd is vir die biologiese sisteem. Voorbeelde hiervan is insektisides en karsinogene omgewingsvreemde verbindings.

X-gekoppelde: Vewys na gene, kondisies of karaktereienskappe wat oorgedra mag word deur middel van die X-chromosoom.

Opsomming

Die studie van koolhidraatstruktuur en -metabolisme het gelei tot die identifikasie van die biochemiese belangrikheid van dié verbindings in die menslike liggaam. Metaboliese defekte in die koolhidraatmetabolisme, soos galaktosemie en glikogeenstoringsiekte, lei tot 'n ernstige kliniese beeld en het 'n direkte invloed op die energievoorsiening in die liggaam. Die betrokkenheid van koolhidrate in multifaktoriale siektes soos Huntington se siekte en Alzheimer se siekte is ook bevestig (Burke *et al*, 1996). Die toename in die betrokke siektetoestande het bygedra tot die ontwikkeling van analitiese tegnieke soos massaspektrometrie.

Die algemene siftingsprosedure vir koolhidraatdefekte word tans met behulp van dunlaagchromatografie uitgevoer. Die metode is vinnig en redelik kwalitatief, maar definitiewe identifikasie en die invloed van medikasie op die analise bly problematies (Sewell, 1991:219). Verdere analitiese tegnieke is nodig vir die doeltreffende identifikasie van koolhidrate. In hierdie studie word aanvullend tot dunlaagchromatografie, 'n meer sensitiewe kwalitatiewe metode beskryf, gebaseer op 'n pre-kolom derivatisering en LC-MS-MS skeiding sowel as MS-MS skandering. Derivatisering van mono-, di-, en oligosakkariede is uitgevoer met 1-feniel-3-metiel-2,5-pyrazalone (PMP) om chromatografiese skeiding en massaspektrometriese deteksie te verbeter (Rozakalis *et al*, 2002). Ketose-suikers is egter nie analiseerbaar met behulp van laasgenoemde metode nie, omrede die derivatisering van die verbindings ongunstig is. Die metode is aangevul met 'n spektrofotometriese identifikasie van fruktose (kleurreaksie met behulp van 'n triptamien-reagens) (Taylor, 1995:215).

Hierdie drieledige benadering word voorgestel as 'n effektiewe siftingsmetode om koolhidraatmetaboliese siektes met groter sekerheid te identifiseer. In die studie is

aangetoon dat die gebruik van die LC-MS-MS analyses die dunlaagchromatografiese resultate bevestig, (veral wanneer afwykende gevalle, soos byvoorbeeld galaktosemie, voorkom). Tweedens is 'n verskeidenheid van oligosakkariedoses, naamlik glikogeenstoringsdefekte, α -mannosidose, β -mannosidose en fukosidose suksesvol met behulp van tandem-massaspektrometrie geïdentifiseer. Laastens is spektrofotometriese analyses aangewend in gevalle waar moontlike fruktose afwykings ter sprake was. Deur hierdie benadering te volg, is die effektiewe identifikasie van koolhidrate, wat direk of indirek vir metaboliese siekte toestande verantwoordelik is, moontlik.

Abstract

The study of carbohydrate structure and –metabolism has indicated the importance of these compounds in the human body. Metabolic defects in the carbohydrate metabolism, for example galactosemia and glycogen storage disease, result in serious clinical complications as well as a direct influence on the energy production in the body. The involvement of carbohydrates in multifactorial diseases has been confirmed (Burke *et al*, 1996:609). The increase of all these diseases contributed to the development of analytical techniques like mass spectrometry.

At present, the screening procedure for carbohydrate defects, is done by thin layer chromatography. The method is fast and reasonable qualitative, but problems may occur with definite identification as well as the influence of medication on the analysis (Sewell, 1991:219). Mass spectrometry will be used complementary to thin layer chromatography in this study. The MS-analysis are based on pre-column derivatisation as well as MS-MS and LC-MS-MS detection and separation. Mono-, di-, and oligosaccharides are derivatised by PMP (1-phenyl-3-methyl-2,5-pyrazalone) and subjected to MS-MS and LC-MS-MS analysis (Rozakalis *et al*, 2002). A complimentary analysis of ketose sugars is used in this study. Derivatization of fructose and fructose containing metabolites are unfavourable. Thus, an additional spectrophotometric method is implemented for the identification of fructose and related compounds (colour reaction with a thryptamine reagent) (Taylor, 1995:215).

This three way approach is an effective screening procedure for the definite identification of carbohydrate metabolic diseases. It is indicated in this study that the use of LC-MS-MS analysis may be confirmative to the TLC-results (especially in the disorders like galactosemia). A variety of oligosaccharidoses, for example glycogen

storage disease, α -mannosidosis, β -mannosidosis and fucosidosis, are successfully identified by tandem mass spectrometry. An additional spectrophotometric analysis confirms a possible fructosuria or fructose related defect. Through this approach, effective identification of carbohydrates, which may be linked to a carbohydrate metabolic disease or other carbohydrate related diseases, is made.

Hoofstuk 1

Inleiding en probleemstelling

Die kompleksiteit van koolhidraatstrukture, -metabolisme en bydrae van koolhidrate tot normale lewe word in 'n groot mate onderskat en onderbeklemtoon. Tot onlangs was aangebore defekte van die koolhidraatmetabolisme beperk tot diabetes, galaktosemie, fruktosurie, glikogeenstoringsdefekte, mukopolisakkaridoses en oligosakkaridoses. Eenvoudige suikerverbindings is hoofsaaklik betrokke in energieproduksie en speel soms 'n rol in komplekse struktuurproduksie. Die bestudering van ander koolhidraatbevattende strukture soos: glikoproteïene, proteoglikane en glikolipiede vertoon problematies as gevolg van komplekse struktuur sowel as onduidelikhede oor die funksie daarvan in die liggaam. Die studie in glikobiologie het die totstandkoming van “glycomics” bewerkstellig, waar die funksionele en strukturele rol van koolhidrate bestudeer word met behulp van gevorderde analitiese metodes (Lamari *et al*, 2003:16).

Die komplekse rol van koolhidrate het gelei tot die implisering van die verbindings in moontlike siektetoestande soos arteriosklerose, kankers en rumatoïed artritis. Verdere identifikasie van koolhidraat-defektiewe-glikoproteïen defekte, die glikoliseweg (wat in elke weefseltipe uniek is) en die rol wat die metabolisme moontlik speel in neurodegeneratiewe siektes soos Alzheimer se siekte en Huntington se siekte, het 'n totale ander lig gewerp op koolhidrate en koolhidraatmetabolisme (Burke *et al*, 1996). Die rol wat koolhidrate en koolhidraatmetabolisme in ander siektes soos: hipertensie, obesiteit, hartprobleme en talle kroniese siektetoestande speel, tree al meer op die voorgrond en hierdie metaboliese defekte is waarskynlik die nuwe groot groep defekte wat in die nabye toekoms as metaboliese defekte beskryf sal word.

Die belangrikste rede vir die gebrek in kennis van koolhidraatmetabolisme sluit bogenoemde faktore in, maar kan veral toegeskryf word aan die onvermoë om koolhidrate te analiseer. Sekere eienskappe, naamlik identiese struktuur- en chemiese eienskappe van monosakkariede, die hoë polêre aard van koolhidrate, die teenwoordigheid van 'n groot aantal hidroksielgroepe, gebrek aan eenvoudige deteksietegnieke, hoë molekuleêre massas

van die oligosakkariede en polisakkariede en die feit dat meeste metabolisering van koolhidrate plaasvind as fosfo-esters of ander komplekse verbindings, het in 'n groot mate bygedra tot die leemte in die kennis van die koolhidraatmetabolisme (Shen & Pernault, 1998:48). Tot onlangs was dunlaagchromatografie en chemiese kleuringstegnieke nog die enigste tegnieke om koolhidrate te analiseer. Hierdie tegniek word tans nog in baie laboratoriums gebruik, ten spyte daarvan dat dit een van die oudste bekende analitiese tegnieke is en ander meer gevorderde tegnieke ontwikkel word (Sewell, 1991:224).

Die naam koolhidrate is afgelei van "hidrate van koolstowwe" en sluit 'n groot groep polihidroksiekarboniel verbindings in. Dié verbindings en hulle derivate is reeds in 1844 deur K Schmidt benoem. Hierdie benaming van koolhidrate is behou, ten spyte daarvan dat dit chemies nie korrek is nie, aangesien verbindings ook aminosuikers en mukopolisakkariede insluit. Die IUPAC benaming van koolhidrate is in 1969 gepubliseer (Moss, 1996). Koolhidrate maak 'n groot gedeelte van die massa van elke lewende sel uit en die groep molekules word verdeel in monosakkariede (kan nie in kleiner eenhede deur hidrolise verkry word nie), oligosakkariede (2 tot 10 monosakkariede wat deur suur- of ensiemhidrolise in subeenhede verdeel kan word) en polisakkariede (bestaan uit meer as 10 monosakkariede wat met hidrolise verkry kan word). Die klassifikasie word later bespreek.

Die rol van koolhidrate in lewende selle is in sommige gevalle algemene kennis en in ander gevalle is daar slegs oor die funksies gespekuleer. Monosakkariede soos Glukose (en onder sekere omstandighede ook galaktose en fruktose), is die hoofbron van energie in die liggaam, maar dien ook as voorlopers vir die biosintese van talle lewensbelangrike strukturele koolhidrate (Garrett & Grisham, 2002:205). Oligo- en polisakkariede speel ook 'n belangrike rol in molekules soos DNA, RNA glikoproteïene, proteoglikane en glikolipiede, wat nie net 'n strukturele funksie het nie maar ook noodsaaklik is vir sellulêre gebeure soos differensiasie, proliferasie en seintransduksie (Lamari *et al*, 2003:16).

Die onvermoë van enige ensiem om 'n reaksie in 'n metaboliese weg (anabolisme of katabolisme) normaal te kataliseer, kan potensieel lei tot 'n verandering in die metabolietprofiel (metaboloom) van die betrokke sel of in die bloed en/of uriene.

Metaboliëprofilering kan dus potensieel aangewend word vir die opsporing van defektiewe ensieme of aangebore metaboliese defekte. Hierdie beginsel vorm reeds vir 'n aantal dekades die ruggraat vir die identifisering van aangebore metaboliese defekte en meer as 500 aangebore metaboliese defekte (insluitend defekte van die koolhidraatmetabolisme) kan reeds op dié wyse geïdentifiseer word. In die afgelope dekades het dit duidelik geword dat die opsporing van nuwe metaboliese defekte afhanklik is van die ontwikkeling van gesofistikeerde analitiese metodes en benaderings. Chemiese kleuringsmetodes en papierchromatografie is oorspronklik gebruik vir die identifisering van defekte soos PKU (fenielketonurie), alkaptonurie en galaktosemie (Shih, 191:45). Loonuitruilingschromatografie het aanleiding gegee tot die beskrywing van 'n totale familie defekte van die aminosuurmetabolisme en gaschromatografie tot organiese suurmetabolisme (Sweetman, 1991:144). Tandem-massaspektrometrie is een van die nuutste tegnologieë wat aangewend word vir die doel van aangebore metaboliese defek identifisering en het aanleiding gegee tot die ontdekking van talle vetsuurmetabolisme defekte (Ramsay *et al.*, 2003:194). Die kompleksiteit van die koolhidraatstrukture en -metabolisme het egter daartoe bygedra dat die verouderde dunlaagchromatografie (papierchromatografie) steeds aangewend word vir die opsporing van defekte van die koolhidraatmetabolisme. Gevolglik was opsporing van dié defekte beperk en die interpretasie van resultate onderworpe aan subjektiewe interpretasie en ondervinding. Dit het weinig ontwikkeling in die gebied laat plaasgevind. Met die ontwikkeling van nuwe massaspektrometrie tegnieke, byvoorbeeld tandem massaspektrometrie, is die moontlikheid geïdentifiseer om 'n meer noukeurige tegnologie aan te wend vir die deteksie van defekte van die komplekse koolhidraatmetabolisme (Lamari *et al.*, 2003:16).

Voordat enige nuwe metaboliese defekte egter opgespoor en geïdentifiseer kan word, is dit noodsaaklik dat reeds bekende metaboliese defekte met dié nuwe tegnologie waargeneem word. Die doel van die studie is dus om effektiewe deteksie van urinêre koolhidrate daar te stel om moontlike koolhidraatdefekte en ander koolhidraatverwante siektes te identifiseer. Die kombinasie van dunlaagchromatografie, massaspektrometrie en spektrofotometrie sal in die studie gebruik word om 'n doeltreffende siftingsprosedure te ontwikkel om sodoende 'n bevestigende diagnose te lewer. Dunlaagchromatografie en spektrofotometrie word

gebruik in die identifikasie van potensiële afwykings. 'n Gevorderde metode wat voor-kolom derivatisering (PMP) en sodoende skeiding tussen struktureel eenderse koolhidrate fasiliteer, word verder in die studie ondersoek. Massaspektrometrie word eksperimenteel aangewend in die deteksie van koolhidraat PMP-derivate. 'n Unieke 175 m/z dogterioon en groepspeisifieke moederione bied deteksiemoontlikhede vir monosakkariedes, disakkariedes, oligosakkariedes sowel as groter koolhidraatstrukture (Rozaklis *et al*, 2002:131).

Die studie maak 'n suksesvolle bydrae tot die opsporing van potensiële koolhidraatafwykings. Onderskeid tussen 'n moontlike metaboliese defek, medikasiemetaboliete en dieetverwante veranderinge is duidelik waarneembaar met dié toepaslike metode. Moontlike identifikasie van ander lisosomale storingsiektes en mukopolisakkaridoses, kan met behulp van hierdie sensitiewe metode ondersoek word. Die analise mag derhalwe van groot belang wees in die sifting van koolhidraatverwante siektes (Ramsey *et al*, 2003:193).

Hoofstuk 2

Struktuur en funksionele rol van koolhidrate in die liggaam

2.1 Inleiding

Chemiese struktuur en eienskappe is twee van die belangrikste faktore wat 'n rol speel in suksesvolle analyses van enige molekule en dus ook van koolhidrate. Om dié rede is dit belangrik om in die studie weer aandag aan die aspek te gee. Die struktuur van koolhidrate is reeds vroeg in die vorige eeu opgelos en Walter N Haworth het dan ook in 1937 die Nobelprys vir die werk ontvang. Tydens sy Nobelprys lesing het hy opgemerk: *"Twenty years ago it could have been said that the wealth of natural products, which comprise the carbohydrate group, was bewildering in its complexity. Such materials as cellulose, glycogen, and starch seemed almost beyond the range of structural investigation."* Ten spyte van geweldige ontwikkeling in analitiese tegnologie is bogenoemde opmerking steeds geldig, veral in die geval van roetine analyses soos dit benodig word vir die opsporing van aangebore metaboliese defekte.

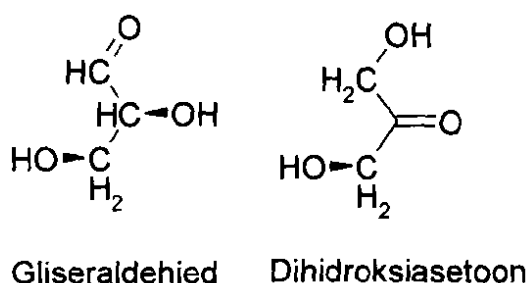
Koolhidrate is wit kristaleerbare verbindings wat meestal goed wateroplosbaar is en oor die algemeen 'n soet smaak het. Chemies is Koolhidrate polihidroksialdehide of polihidroksiketone wat in vier groepe geklassifiseer kan word, naamlik monosakkariede (die eenvoudigste subeenheid van koolhidrate wat deur hidrolise verkry kan word), afgeleide monosakkariede, oligosakkariede en polisakkariede. Monosakkariede, soos wat die benaming impliseer, het lae molekulêre massas en kan beskou word as hidrate van koolstof met die algemene formule $(\text{CH}_2\text{O})_n$ waar n die getal 3 tot 9 kan verteenwoordig. Afgeleide monosakkariede bevat ander funksionele groepe as karboniel- en hidroksielgroepe. Monosakkariede en afgeleide monosakkariede is dan die eenvoudigste vorm waarin koolhidrate voorkom en is die herhalende eenhede wat oligosakkariede en polisakkariede vorm. Disakkariede is die eenvoudigste oligosakkariede wat slegs uit twee monosakkariede, verbind deur middel van 'n glikosidiesebinding, bestaan. Op grond van die hoeveelheid monosakkariede kan oligosakkariede dan tri- tetra-, penta- (tot en met dekasakkariede) wees. Polisakkariede is makromolekulêre polimere met molekulêre massas van tot 1 000 000 ame. Sommige bevat slegs een tipe monosakkaried

(homopolisakkariede) terwyl ander weer 'n verskeidenheid monosakkariede kan betrek (heteropolisakkariede) (Garret & Grisham, 2005:203).

2.2 Monosakkariede

2.2.1 Struktuur

Monosakkariede word op grond van die hoeveelheid koolstowwe, die teenwoordigheid van 'n aldehied of 'n ketogroep en asimmetriese koolstowwe geklassifiseer. Die eenvoudigste monosakkariede bevat slegs drie koolstowwe (trioses) en slegs twee monosakkariede, naamlik gliseraldehied en dihidroksiasetoon, kom in die groep voor.

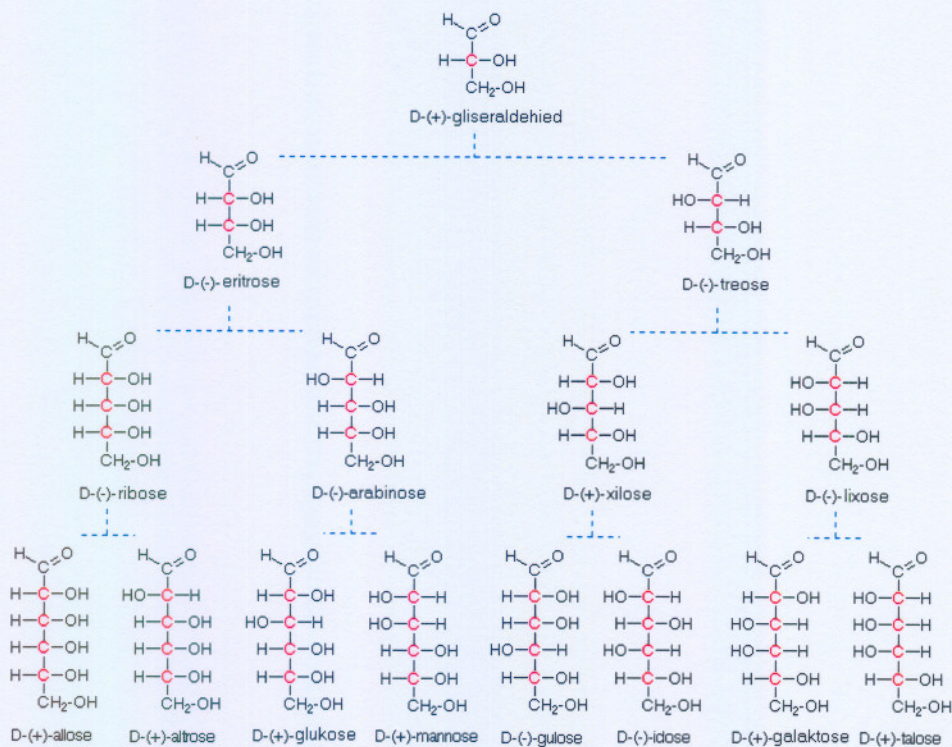


Figuur 2.2.1.1 Monosakkariede van die triose groep (Mcmurry, 1995:1014)

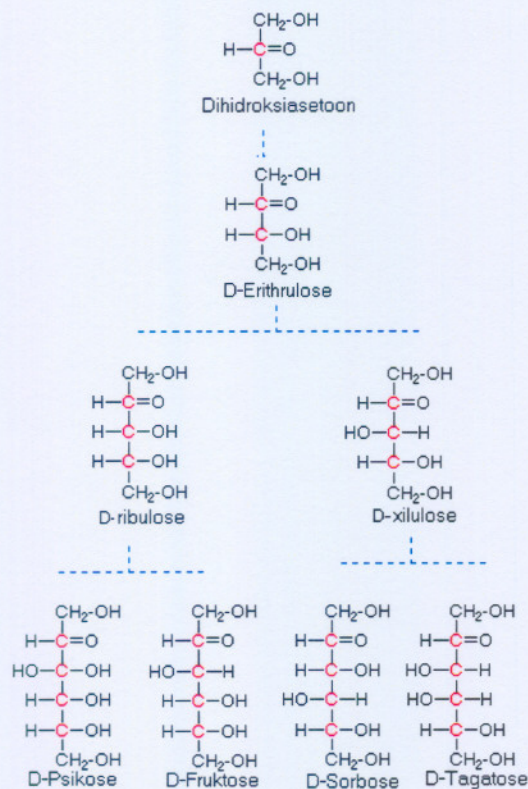
Omrede gliseraldehied drie koolstofatome en 'n aldehiedgroep bevat, staan dit as 'n aldotriose bekend. Dihidroksiasetoon, met 'n ketogroep teenwoordig, staan bekend as 'n ketotriose. Die asimmetriese koolstof wat in gliseraldehied teenwoordig is, suggereer die moontlikheid van enantiomere. Gliseraldehied kan dus as D- en L-gliseraldehied aangetref word. Generiese name van die aldoses benoem die getal koolstofatome wat in die koolhidraat teenwoordig is en op grond van die teenwoordigheid van drie, vier, vyf, ses of sewe koolstofatome word die benaming trioses, tetroses, pentoses, heksoses en heptoses onderskeidelik gebruik. In die geval van ketoses word "ul" as 'n tussenvoegsel gebruik terwyl die res van die benamings korrespondeer met dié van die aldoses, byvoorbeeld pentulose, heksulose en heptulose (Garrett & Grisham, 2005:204).

Aldoses met drie of meer en ketoses met vier of meer koolstowwe, bevat asimmetriese koolstowwe. Tradisioneel word “D” en “L” aangewend om die konfigurasie te benoem, maar indien die spesifieke rotasie benoem moet word, word die skuinsgedrukte letters “*d*” en “*l*” of (+) en (-) aangewend om die dekstro-roterende en levo-roterende spesifieke rotasie onderskeidelik aan te toon. Deur konvensie is voorgestel dat die “D” en “L” konformasie benaming aangewend word om te verwys na die konformasie van die asimmetriese koolstofatoom wat die verste van die karbonielgroep geleë is (Garrett & Grisham, 2005:207).

Aangesien monosakkariede (wat in lewende selle aangetref word) selde in die L-konformasie is en heksoses en heptuloses nie ’n groot rol in biologiese materiaal speel nie, sal hierdie monosakkariede in die res van die hoofstuk geïgnoreer word. In Figuur 2.2.1.2 en 2.2.1.3 word die liniêre strukture, ook genoem *Fischer projeksies*, van die meer algemeen biologiese monosakkariede gegee.



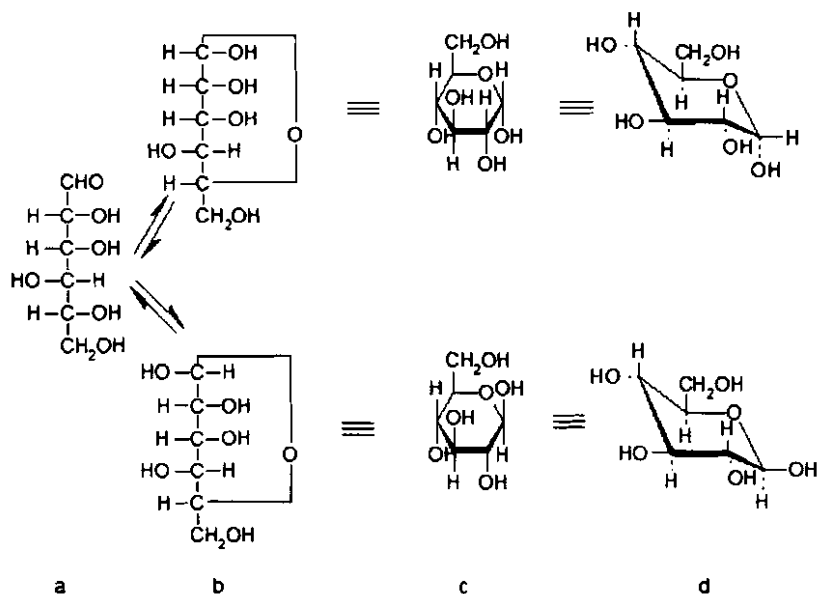
Figuur 2.2.1.2: *Fischer projeksies* van die mees algemene aldoses wat in biologiese materiaal voorkom (Voet en Voet, 1996:252).



Figuur 2.2.1.3: *Fischer projeksies* van die mees algemene ketoses wat in biologiese materiaal voorkom (Voet en Voet, 1996:253).

Aldehiede en ketone ondergaan vinnige maar omkeerbare nukleofiliese addisie-reaksie met alkohole om onderskeidelik hemisetals en hemiketals te vorm. Indien die karbonielgroep en hidroksielgroep in dieselfde molekule voorkom, lei dit tot die vorming van sikliese hemisetals en hemiketals. Vyf- en sesledige hemisetals en -ketals is veral stabiel en om dié rede kom talle koolhidrate in 'n ewilibrum van oop-ketting en sikliese vorme voor. Ses koolstofbevattende aldoses (soos glukose) kom dus dikwels in 'n sesledige ringstruktuur voor wat as die *piranose vorm* bekend staan. Die hidroksielgroep op posisie nommer vyf kan mutarotatie ondergaan, wat aan twee verskillende stereoisomere (α en β) (byvoorbeeld α -D-glukose en β -D-glukose (anomere)), oorsprong kan gee. Ses 6-koolstofbevattende ketoses (soos fruktose) kan in 'n ses- (piranose) of vyfledige ringstruktuur aangetref word, wat as die *furanose vorm* bekend staan (Voet & Voet, 1996:255).

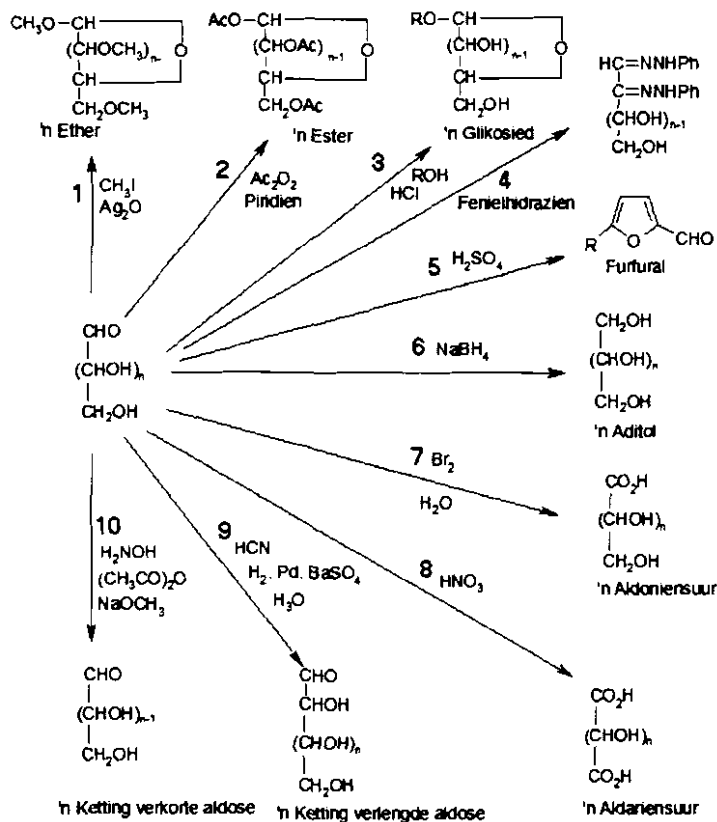
Soos met die meeste sikloheksaanbevattende strukture, het die koolhidrate in die *piranose vorm* 'n stoelagtige of bootagtige geometrie. Koolhidrate met die *furanose struktuur* se geometrie word as koevertagtig en gedraai beskryf. Konvensies vir die strukturele weergawe van koolhidrate, word volgens die Fischer, Tollens en Haworth projeksies gegee (Garrett & Grisham, 2005:209). In Figuur 2.2.1.4 word glukose as voorbeeld gebruik.



Figuur 2.2.1.4: Konvensies vir die strukturele voorstelling van koolhidrate: Fischer (a), Tollens (b) en Haworth (c) en in (d) word die konformasie in die stoelagtige vorm voorgestel (Voet en Voet, 1995:255).

2.2.2 Chemiese eienskappe en reaksies

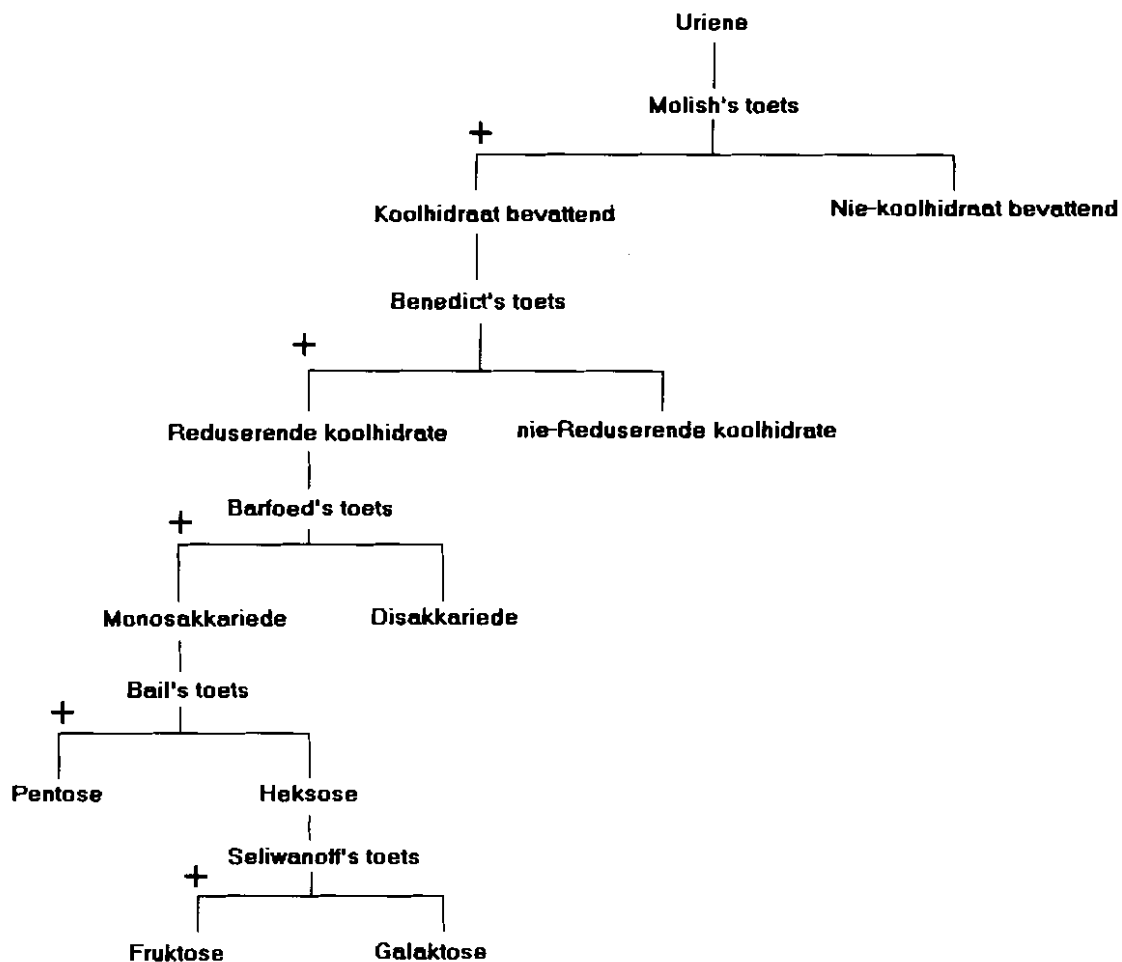
Monosakkariede is goed oplosbaar in water, swakker oplosbaar in alkohole en onoplosbaar in organiese oplosmiddels soos di-eteleter. Omrede die molekules twee tipes funksionele groepe bevat, naamlik karboniel- en hidroksielgroepe, is bekende reaksies van die tipe molekules ook toepasbaar op monosakkariede. Hidroksielgroepe kan esters en eters vorm en geoksideer word en karbonielgroepe kan met nukleofiele reageer en gereduseer word. Die mees bekende en gebruikte chemiese reaksies van monosakkariede word in Figuur 2.2.2.1 voorgestel.



Figuur 2.2.2.1: Skematiese voorstelling van algemene chemiese reaksies wat koolhidrate kan ondergaan (McMurry, 1995:1024-1033).

Reaksies, soos in Figuur 2.2.2.1 aangetoon, vorm die basis van verskeie reaksies wat aangewend kan word tydens analyses van koolhidrate - insluitend chemiese kleuringsreaksies, chromatografie en massaspektrometrie.

Drie chemiese eienskappe word veral in kleuringsstegnieke van koolhidrate gebruik, naamlik die vorming van furfuralverbindings in die teenwoordigheid van swawelsuur, die reduserende vermoë van monosakkariede en die reaksie van koolhidrate met feniellhidrazien. Sommige van die toetse is baie spesifiek terwyl ander weer koolhidrate in die algemeen kan analiseer (Wistler *et al*, 1962:478). Hierdie toetse word gewoonlik aangewend in 'n spesifieke volgorde, soos in Figuur 2.2.2.2 voorgestel, om die identiteit van koolhidrate te bepaal.



Figuur 2.2.2.2: Die toets en identifikasie van koolhidrate met behulp van hul chemiese eienskappe (opsommend saamgestel uit Wistler *et al.*,1962).

Vorming van esters, eters en suikeralkohole word aangewend vir die analyses van koolhidrate, bykans uitsluitlik monosakkariede, met behulp van gaschromatografie of gaschromatografie-massaspektrometrie en die vorming van glikosiede kan aangewend word vir tandem-massaspektrometrie analyses. Elk van die reaksies toon potensiaal om vir roetine analyses van koolhidrate aangewend te kan word, met sekere voor- en nadele. Omrede koolhidrate ook in 'n alkoholvorm kan wees, kan perjodaat gebruik word om die verbindings te degradeer of om deur middel van ringsplyting oorsprong aan 'n aldehied te

gee. Die verhouding van mieresuur en formaldehyd, wat gevorm word, hou verband met die oorspronklike struktuur van die koolhidraat. Glukose word byvoorbeeld volledig geoksideer deur 5 mol HIO_4 om 1 mol formaldehyd en 5 mole mieresuur te vorm. Die gevormde aldehid kan met behulp van verskeie reaksies waarneembaar gemaak word, byvoorbeeld tiobarbituriensuur en metiel-3-benzothiazoloon-hidrozoen. Hierdie reaksie vorm die basis in die analyses van siaalsuur (Whistler *et al.*, 1962:445).

Die chemiese eienskappe van oligosakkariede en polisakkariede moet eers ondersoek word, voordat die moontlike metodes ge-evalueer kan word, aangesien die doel van die studie is om 'n meer akkurate kwantitatiewe metode vir die analyses van koolhidrate te kan ontwikkel. Die metodes moet aan die vereistes van 'n roetinelaboratorium voldoen en die huidige bekende aangebore defekte van die koolhidraatmetabolisme (insluitend oligosakkaried- en polisakkaried metabolisme) moet geïdentifiseer kan word. Die evaluering sal dus later in die hoofstuk uitgevoer word.

2.3 Biologies belangrike monosakkariedderivate

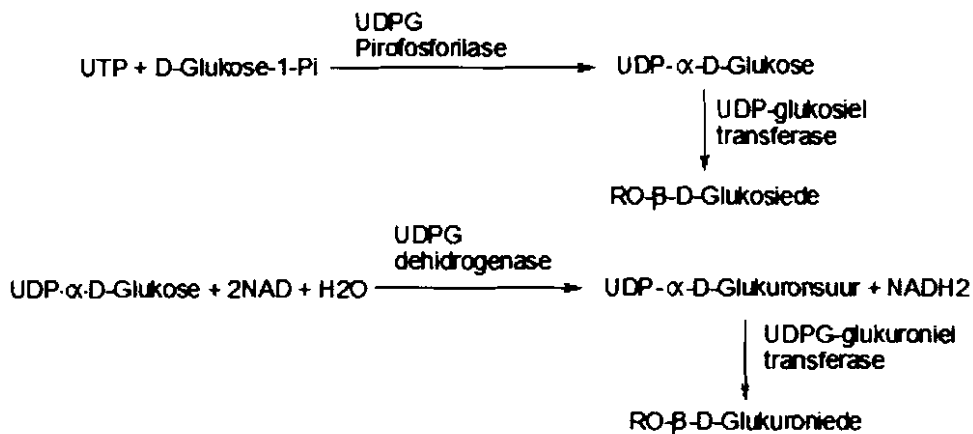
Monosakkariedderivate speel veral in strukturele koolhidrate, maar ook in energieproduksie, 'n belangrike rol. Die noodsaaklikheid om die tipe molekules te analiseer, is om verskeie redes van belang. Monosakkariedderivate vervul 'n belangrike rol in koolhidraatmetabolisme en selfs 'n belangriker rol in koolhidraatbevattende strukturele verbindings. Hierdie molekules verswaar egter die analyses van koolhidrate omrede addisioneel aktiewe groepe by die reeds bestaande aktiewe groepe van koolhidrate gevoeg word.

2.3.1 Glikosiede

Die anomeriese hidroksielgroep van koolhidrate reageer maklik met alkohole om sodoende α - en β -glikosiede te vorm. Die binding van die anomeriese koolstof met die asetale suurstof word na verwys as 'n glikosidiese binding. Glikosidiese bindings is dan ook die bindings teenwoordig in oligosakkariede en polisakkariede, wat twee of 'n groot aantal

monosakkariede bind. Verskeie hidroksielgroepe van die monosakkaried mag glikosidiese bindings ondergaan om oligosakkariede en polisakkariede te vorm (Voet & Voet, 1995:256).

Behalwe vir die vorming van oligosakkariede, wat nie onder hierdie punt bespreek sal word nie, kan glikosiede verskeie ander funksies in die sel hê. Fosfo-esters van koolhidrate speel 'n belangrike rol in koolhidraatmetabolisme en kan ook volgens die chemiese struktuur onder glikosiede geklassifiseer word. Dié verbindings sal ook, vanweë hulle belang en omvang afsonderlik bespreek word. In die menslike sel is detoksifisering deur middel van die vorming van glikosiede ook belangrik. Glikosidering en glukuronidering is 'n wydverspreide reaksie wat in plante sowel as diere voorkom en een van die belangrikste detoksifiserende reaksies in die menslike liggaam. Die primêre doel van die reaksie is om xenobiotika meer wateroplosbaar te maak en sodoende word liggaamsvreemde verbindings deur die niere en galweë uitgeskei. Die reaksie wat in Figuur 2.3.1.1 voorgestel word, maak van hoë energieverbindings soos UDP- α -d-glukose en UDP- α -d-glukuronsuur gebruik. Die resulterende produkte staan as - β -d-glukosiede en - β -d-glukuroniede bekend. Glikosidering vind veral op verbindings met OH-groepe plaas, maar ook op verbindings met COOH, SH en C-C funksionele groepe en glukuronidering op verbindings met OH-groepe maar ook met verbindings met COOH, NH₂, SH en C-C funksionele groepe (Hodgson & Levi, 1994:115).



Figuur 2.3.1.1: Voorstelling van die reaksies by die vorming van glikosiede tydens detoksifisering (Hodgson & Levi,1994:115).

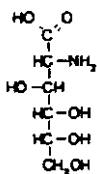
Endogene verbindings (veral steroïede en galsoute) sowel as eksogene verbindings, (xenobiotika), vorm dié tipe glikosiede. Om dié rede is die moontlike glikosiede wat mag voorkom in liggaamsvloeistowwe, bykans onbeperk en kan nie in die studie weergegee word nie. Medikasies soos Valproaat, Antibiotika en Parasetamol word dikwels gebruik en hierdie verbindings word in groot hoeveelhede as glikosiede gedetoksifiseer en uitgeskei (Hodgson & Levi,1994:116).

2.3.2 N-Glikosielamiene (N-Glikosiede)

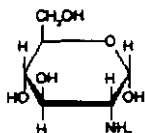
Aldoses en ketoses reageer met amiene om N-glikosielamiene te vorm. Streng volgens die term, sal dié groep afgeleide koolhidrate 'n geweldige groot groep insluit - omrede dit nukleotiede, nukleïensure en N-glikoproteïene insluit. In hierdie studie sal die N-glikosielamiene egter beperk word tot aminosuikers. In laasgenoemde geval word 'n hidroksielgroep op die piranosering vervang met 'n aminogroep. Hierdie tipe afgeleide monosakkariede kom wyd verspreid voor in 'n verskeidenheid van glikokonjugate as geasetileerde glukosamien (N-asetiel- α -d-glukosamien), galaktosamien (N-asetiel- α -d-galaktosamien) en mannosamien (N-asetiel- α -d-mannosamien) en siaalsuur (Garrett & Grisham, 2005:214). Siaalsuur is N-asetiel- of N-glikolielderivate van 3,5-dideoksi-5-

aminononulosoniensuur (neuramiensuur). Diasetielderivate, waar 'n tweede asetielgroep op die hidroksielgroep van C-4, C-7, C-8 of C-9 kan voorkom, kom ook voor. Die asetielgroep op posisie C8 kan met 'n metielgroep of 'n sulfaatgroep en C9 met 'n fosfaatgroep of laktoielgroep vervang wees. Die strukture van die aminosuikers word in Figuur 2.3.2.1 en die siaalsuurfamilie in Figuur 2.3.2.2 voorgestel.

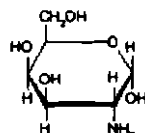
Meer as 40 lede van die siaalsuurfamilie is reeds beskryf. Neuramiensuur kom nie in die natuur voor nie, terwyl N-Asetielneuramiensuur (Neu5Ac) en N-glikolielneuramiensuur (Neu5Gc) die hoogste voorkoms het. Laasgenoemde is egter die uitsondering by die mens waar slegs spoorhoeveelhede van Neu5Gc in kankerselle opgespoor is, maar gewoonlik afwesig is in normale selle (Shauer, 2004:50). Deaminoneuramiensuur (KDN) kom in baie lae konsentrasies in menslike weefsel voor met verhoogde vorming en teenwoordigheid in fetale naelstringbloed en ovarium kankerselle.



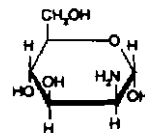
Glukosamiensuur



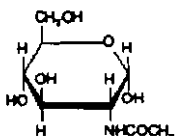
Glukosamien



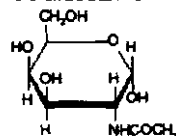
Galaktosamien



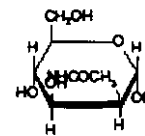
Mannosamien



N-Asetielglukosamien (GlcNAc)

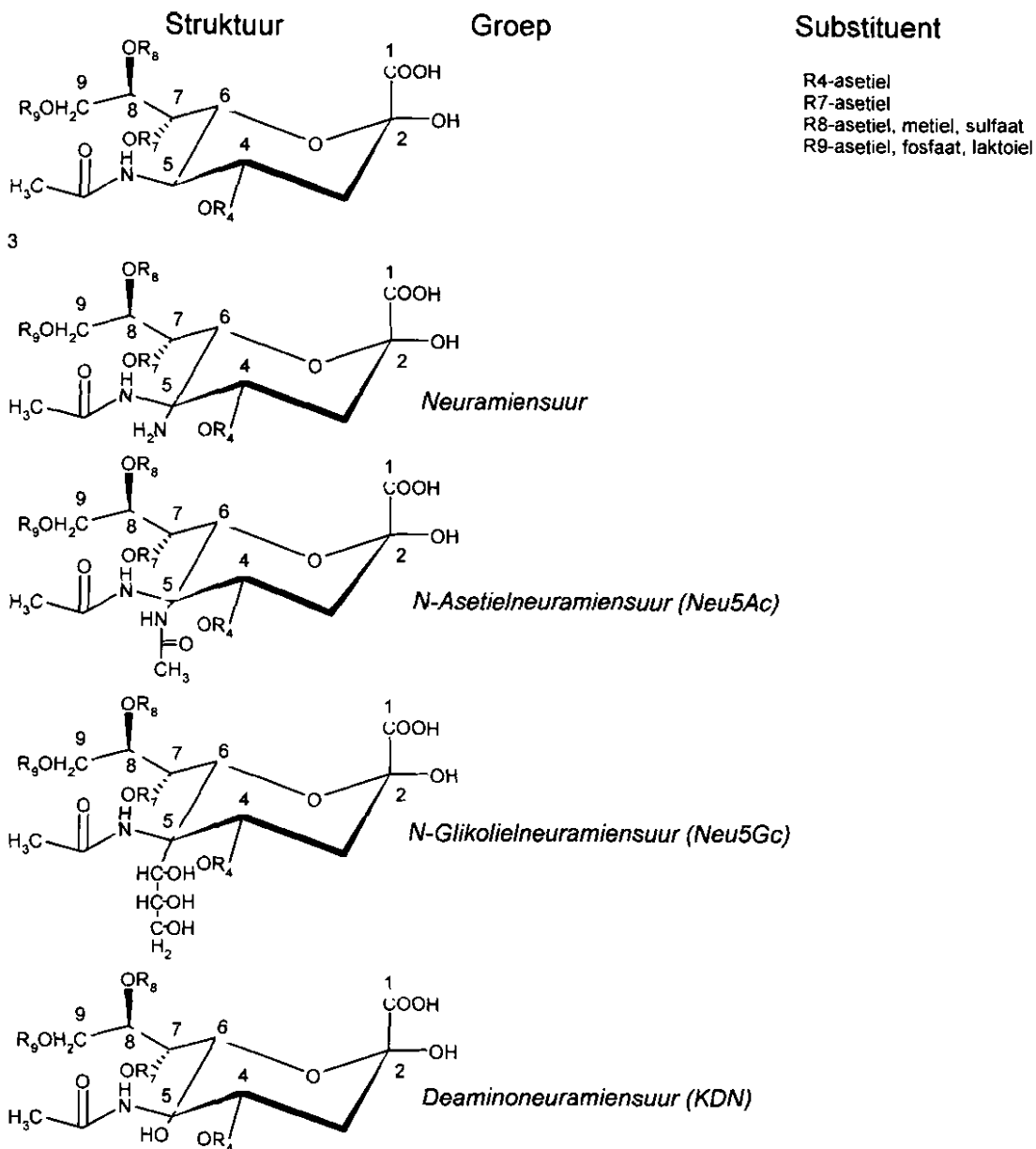


N-Asetielgalaktosamien (GalNAc)



N-Asetielmannosamien (ManNAc)

Figuur 2.3.2.1: Voorstelling van die strukture van aminosuikers wat in die metabolisme aangetref word (Kanehisa Laboratories, 2005).



Figuur 2.3.2.2: Chemiese strukture van die belangrikste verteenwoordigers van die siaalsuurfamilie, Neu5Ac (2-keto-5-asetamido-3,5-dideoksie-D-glisero-D-galakto-piranos-1-oniensuur) en die mees algemene modifikasies (Kanehisa Laboratories, 2005).

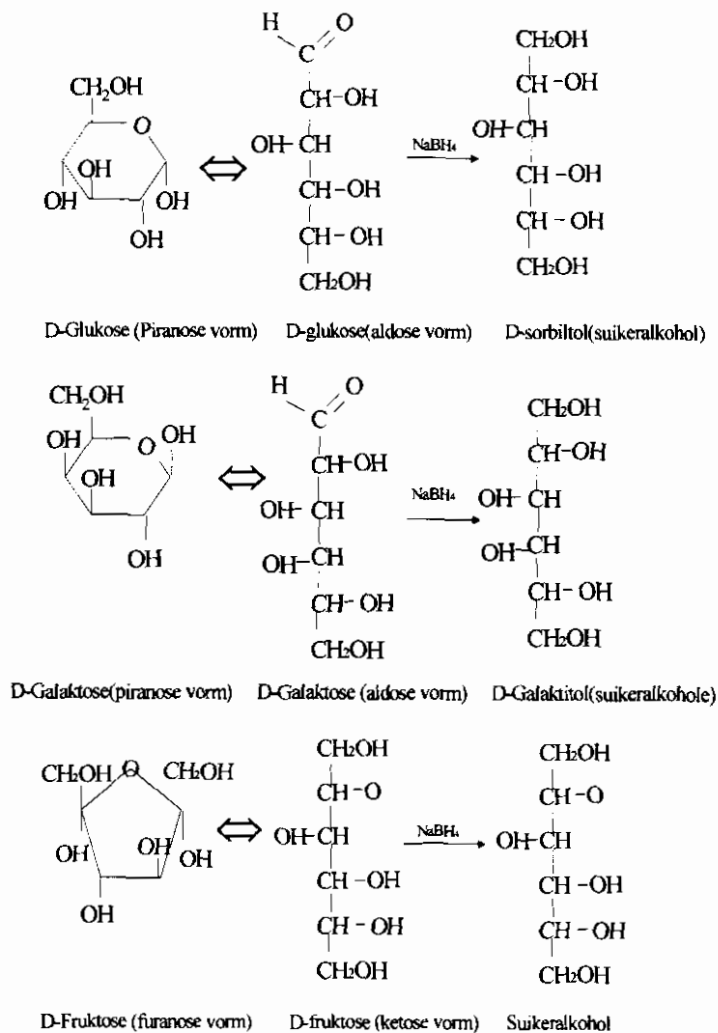
Aminosuikers (insluitend siaalsuur) vertoon steeds die meeste chemiese eienskappe en dus ook reaksies van koolhidrate met die addisionele moontlike eienskappe van die aminogroepe. Perjodaatringssplyting, as gevolg van die teenwoordigheid van viserale hidroksielgroepe met opvolgende kleuringreaksies van die gevormde aldehid, is die basis

vir die metodes wat aangewend word om siaalsuur te bepaal (Hommes, 1991:234). Asilering van die aminogroepe is een van die addisionele chemiese reaksies wat aangewend kan word as gevolg van die teenwoordigheid van die tipe groepe in aminosuikers. In die geval van siaalsuur moet die asilering voorafgegaan word deur deasetilering. Organiese-anhidriede (byvoorbeeld benzoïel-anhidried) en chloriede (byvoorbeeld p-tolueensulfonielchloried) kan veral in dié opsig aangewend word omrede die produkte UV-absorberend is en bepaling met eenvoudige kolometriese metodes uitgevoer kan word (Gopaul & Cook, 2006:2).

Nie slegs die struktuur van siaalsuur nie, maar ook die funksie van siaalsuur laat die moontlikheid van addisionele reaksie toe. As gevolg van die funksie wat siaalsuur speel, is dit moontlik om anti-liggame te gebruik vir analyses van siaalsuurbevattende strukture.

2.3.3 Suikeralkohole

Die karbonielgroep van monosakkariede kan chemies of ensiematies gereduseer word om die korresponderende suikeralkohol te vorm. Hoewel suikeralkohole, met die uitsondering van gliserol en inositol, nie 'n groot rol in die liggaam speel nie, kom dit dikwels by defekte van die koolhidraatmetabolisme soos galaktosemie en diabetes voor. Die verbindings word waarskynlik gevorm indien koolhidrate teenwoordig is in baie hoë konsentrasies. Soms word die kliniese simptome, soos katarakte, toegeskryf aan die teenwoordigheid van suikeralkohole (Duran *et al*, 1996:281). Die strukture van die mees algemene suikeralkohole wat in die liggaam aangetref word, word in Figuur 2.3.3.1 voorgestel.



Figuur 2.3.3.1: Die struktuur en vorming van suikeralkohole (Voet & Voet, 196:257).

Die chemiese reaksies wat suikeralkohole kan ondergaan, is in vele opsigte baie eenvoudiger as dié van die korresponderende koolhidraat wat toegeskryf kan word aan die afwesigheid van die karbonielgroep. Die afwesigheid van die karbonielgroep beperk die verskeidenheid van reaksies wat die verbindings kan ondergaan, maar dit versterk ook die enkele reaksie wat die analiseerbaarheid van die molekules vergemaklik, naamlik etervorming en estervorming. Eters en esters is goed analiseerbaar met gaschromatografie wat uitstekend in roetinelaboratoriums aangewend kan word. Suikeralkohole is ook

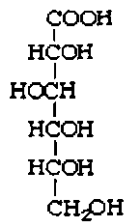
gedeeltelik oplosbaar in organiese oplosmiddels wat die totale benadering tot roetine analises vergemaklik (Kusmeirz *et al*, 1989:47).

2.3.4 Suikersure

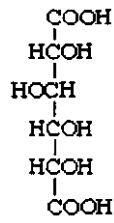
Drie belangrike suikersure kom voor, naamlik aldonien-, aldarien- en uroniensure (Figuur 2.3.4.1). Die aldoniensure (byvoorbeeld d-glukoniensuur) is van die aldoses afgelei en die karbonielgroep is geoksideer tot 'n karboksielgroep. Aldoniensuur kan chemies verkry word, deur gebruik te maak van 'n swak oksiderende agent, maar kom ook soms voor as intermediêre in die koolhidraatmetabolisme (as fosfoeters) (Moss, 1996).

Aldariensure (ook sakkariensure genoem), byvoorbeeld d-glukariensuur, word vanaf aldoses gevorm as beide die karbonielgroepe sowel as die hidroksielgroepe die verste van die oorspronklike karbonielgroep na 'n karboksielgroep geoksideer word. Aldariensure is dus suikerdikarboksielsure en speel nie 'n belangrike rol in die metabolisme self nie, maar word deur sterk oksiderende reagense tydens die analise van koolhidrate gevorm (Moss, 1996).

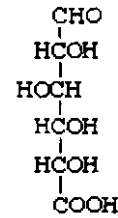
Uroniensure, byvoorbeeld d-glukuronsuur, is die derde groep suikersure en word geproduseer indien die α -hidroksielgroep na 'n karboksiegroep geoksideer word. Die karbonielgroep bly dus onveranderd. Die uroniensure kom dikwels in die metabolisme voor, soms as intermediêre van 'n metaboliese weg, maar het ook 'n unieke rol in byvoorbeeld detoksiferingsreaksies. Askorbiensuur (vitamien C) is 'n uroniensuur met 'n baie belangrike funksie vir normale lewe (Moss, 1996).



D-glukoniensuur



D-glukariensuur



D-glukuronsuur

Figuur 2.3.4.1: Strukture van bekende suikersure (Moss, 1996).

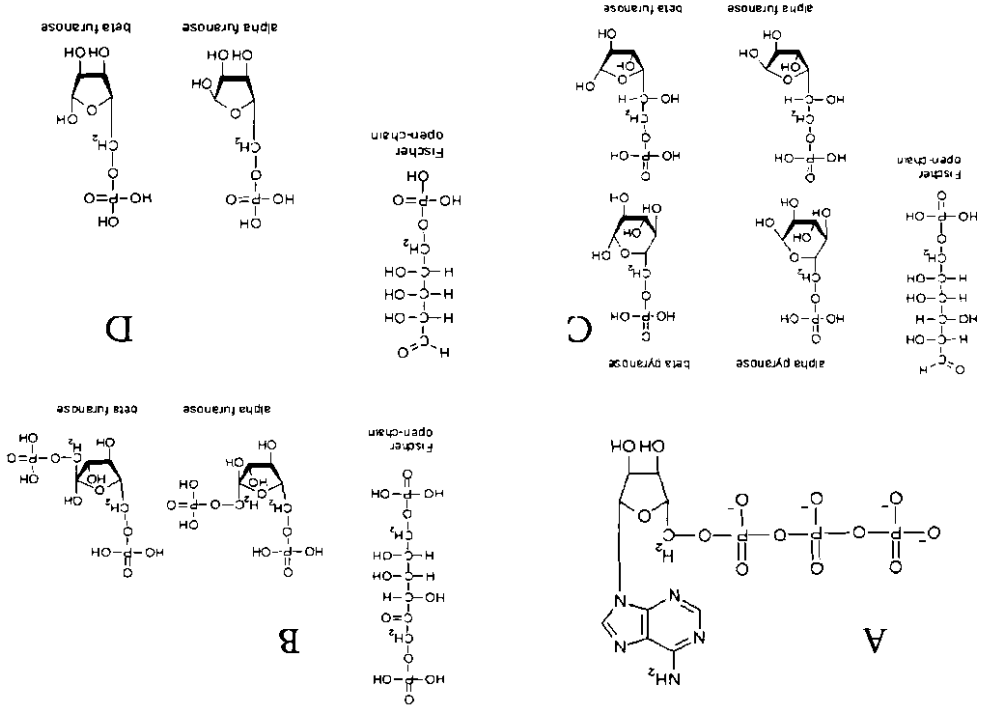
Die aldoniensure en uroniensure kan laktoonvorming ondergaan om laktone van die korresponderende suikersuur te vorm. Aldoniensure kan vyf- of sesledige laktone vorm. Suikersure vertoon meer van die bekende chemiese eienskappe van monosakkariede as die suikeralkohole, waarskynlik omrede dit laktone of ringstrukture kan vorm. Verestering van die karboksielgroep is 'n addisionele chemiese reaksie wat aangewend kan word in die analises van die suikersure, hoewel dit nie groot bykomende voordele bied nie. Suikersure is wel beter oplosbaar in organiese oplosmiddels en soos in die geval van suikeralkohole, kan dit aangewend word in die isolasie van die molekules wat roetine analitiese tegnieke vergemaklik (Garrett & Grisham, 2005:211). Askorbiensuur het sterk reduserende vermoë en hierdie chemiese eienskap kan aangewend word vir die deteksie van die verbinding.

2.3.5 Suikerfosfate

Die vorming van fosfo-esters van monosakkariede is 'n kenmerk van die totale koolhidraatmetabolisme, insluitende die glikoliseweg, pentose-fosfaatweg, galaktosemetabolisme, fruktosemetabolisme, glikogeenmetabolisme, aminosuikermetabolisme en inositolmetabolisme. In baie gevalle is die fosfaatgroepe ook verbind aan ander strukture, byvoorbeeld UDP-monosakkariede (Garrett & Grisham, 2005:212). Enkele van die belangrikste suikerfosfate word in Figuur 2.3.5.1 weergegee.

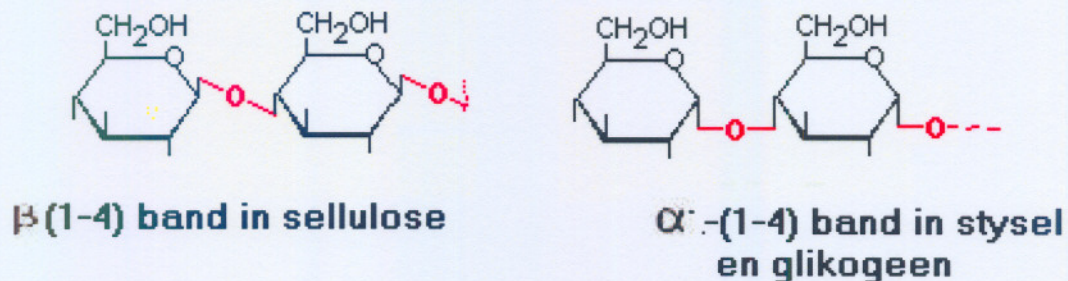
Die hoeveelheid, variatie van strukture, lae konsentrasies waarin die metaboliete voorkom, onstabieliteit en belang van die verbindings dra daartoe by dat spesiale analitiese tegnieke daarvoor gebruik kan en moet word. Om die rede sal nie verder aandag aan die suikertfosfate gegee word in hierdie studie nie. Enkele artikels is egter reeds gepubliseer wat die analises van suikertfosfate met tandem-massaspektrometrie beskryf (Wamelink *et al*, 2005:26). Hierdie tegnieke sal waarskynlik in die toekoms nog baie aangewend word vir die ondersoek en identifisering van defekte van die koolhidraatmetabolisme.

Figuur 2.3.5.1: A) Struktuur van ATP, B) Struktuur van D-fruktose-1,6 bifosfaat, C) Struktuur van glukose-6-fosfaat, D) Struktuur van ribose-5-Fosfaat (Moss, 1996).

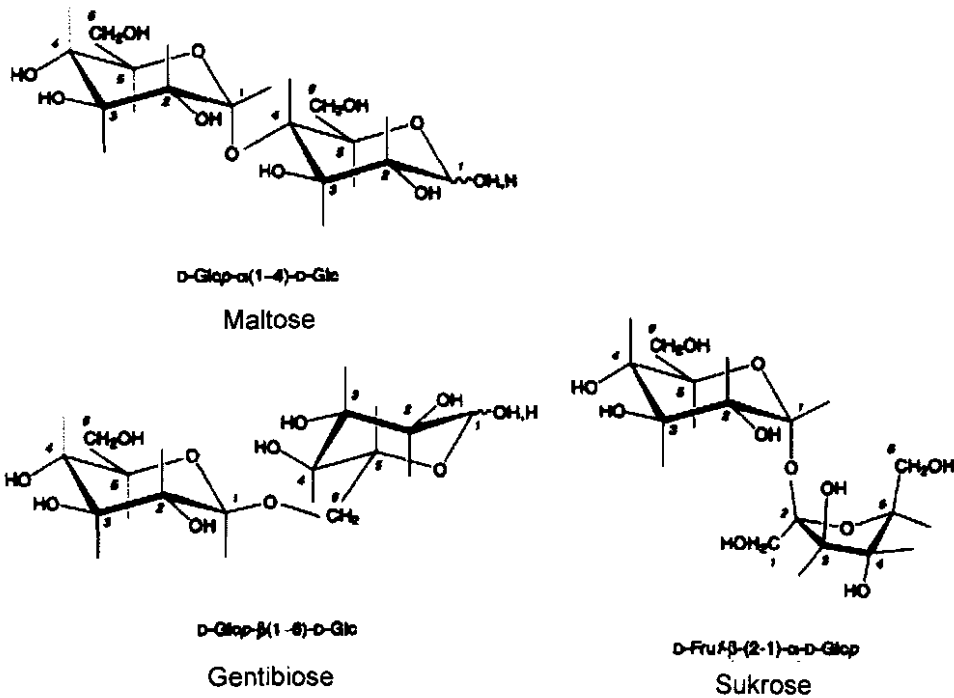


2.4 Oligosakkariede en Polisakkariede

Oligosakkariede word gedefinieer as koolhidrate wat uit twee tot tien monosakkaried eenhede bestaan. Polisakkariede is koolhidrate wat uit meer as tien monosakkaried eenhede bestaan. Die monosakkaried eenhede word deur middel van 'n glikosidiese binding gekoppel, wat oligosakkariede en polisakkariede vorm (Gerrett & Grisham, 2005:215). Die hoeveelheid monosakkariede teenwoordig in die oligosakkaried beïnvloed die benaming van die verbinding. Byvoorbeeld 4 monosakkaried eenhede wat gekoppel word deur glikosidiese bande, word 'n tetrasakkaried genoem. Elke monosakkaried eenheid kan weer in 2 verskillende stereo-isomere voorgestel word, wat verskil ten opsigte van die verbinding se konfigurasie. Die glikosidiese band tussen 2 monosakkariedes word genommer ten opsigte van die koolstowwe wat aan die bindingsproses deelneem. Tabel 2.4.1 gee 'n opsomming van van die biologiese belangrike koolhidraatverbindinge en hul glikosidiese koppeling.



Figuur 2.4.1 'n Skematiese voorstelling van die 2 verskillende stereo-isovorme wat in oligo- en polisakkariede voorkom (Voet en Voet, 1996:259).



Figuur 2.4.2: Skematiese voorstelling van verskeie glikosidiese bande wat tussen monosakkaried eenhede in oligosakkariede en polisakkariede voorkom (Linhorst, 2000:28).

Tabel 2.4.1: Vernaamste koolhidraatverbindings en hul betrokke glikosidiese- bindings (Kennedy & White, 1983:38-39,45).

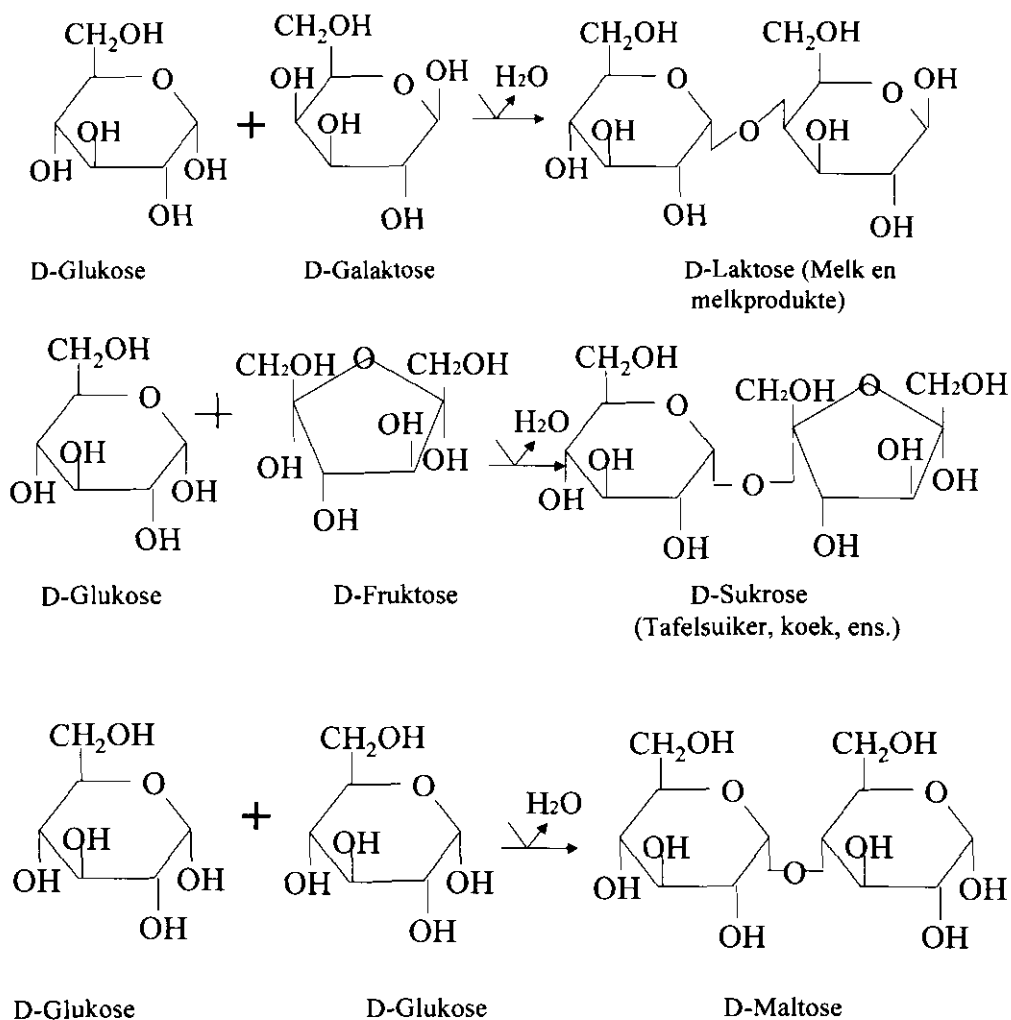
Koolhidraatgroep	Naam van Koolhidraat	Struktuur van koolhidraat
Disakkariede	Laktose	β -D-Gal -(1,4)-D-Glc
	Maltose	α -D-Glc-(1,4)-D-Glc
	Sukrose	α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru
	α,α -Trehalose	α -D-Glc-(1,1)- α -D-Glc
	Melibiose	α -D-Gal-(1,6)-D-Glc
	Isomaltose	α -D-Glc-(1-6)-D-Glc
	Trisakkariede	Maltotriose

	Raffinose	α -D-Gal-(1-6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru
	Melizitose	α -D-Glc-(1,3)- β -D-Fru-(2,1)- α -D-Glc-
	Isomaltotriose	α -D-Glc-(1,6)- α -D-Glc-(1-6)-D-Glc
	Neuramino- laktose	NeuNAc-(2,3)- β -D-Gal -(1,4)-D-Glc
Tetrasakkariede	Sellotetraose	β -D-Glc-(1,4)- β -D-Glc-(1,4)- β -D-Glc-(1,4)-D-Glc
	Maltotetraose	α -D-Glc-(1,4)-D-Glc-(1,4)- α -D-Glc-(1,4)-D-Glc
	Stagiose	α -D-Gal-(1-6)- α -D-Gal-(1-6)- α -D-Glc-(1,2)- β -D-Fru
Komponente van Heteropolisakkariede (GAG's)	Keratansulfaat	β -D-Gal-(1,4)-D-GlcNAc-6-sulfaat
	Chondroitin sulfaat	β -D-Glukuronaat-(1,3)-D-GalNAc-6-sulfaat
	Hialuronaat	β -D-Glukuronaat-(1,3)-D-GlcNAc
	Dermatansulfaat	β -D-Idu-(1,3)-D-GalNAc-4-sulfaat

Oligosakkariede is reeds gedefinieer as 2 tot 10 monosakkaried eenhede wat gekoppel word deur glikosidiese bande. Die vernaamste oligosakkariede is disakkariede wat 'n groot deel vorm van die mens se daaglike dieet. Maltose (komponent van amilose en stysel), laktose of melksuiker en sukrose of tafelsuiker is van die vernaamste disakkariede. Oligosakkariede sowel as polisakkariede kan uit 1 tipe monomeer bestaan (*homopolisakkaried*) of uit verskillende monomere (*heteropolisakkaried*). Oligosakkariede kan ook in reduserende en nie-reduserende oligosakkariede voorkom, afhangende van die teenwoordigheid van 'n vrye hemi-asetal. Sukrose is byvoorbeeld 'n nie-reduserende

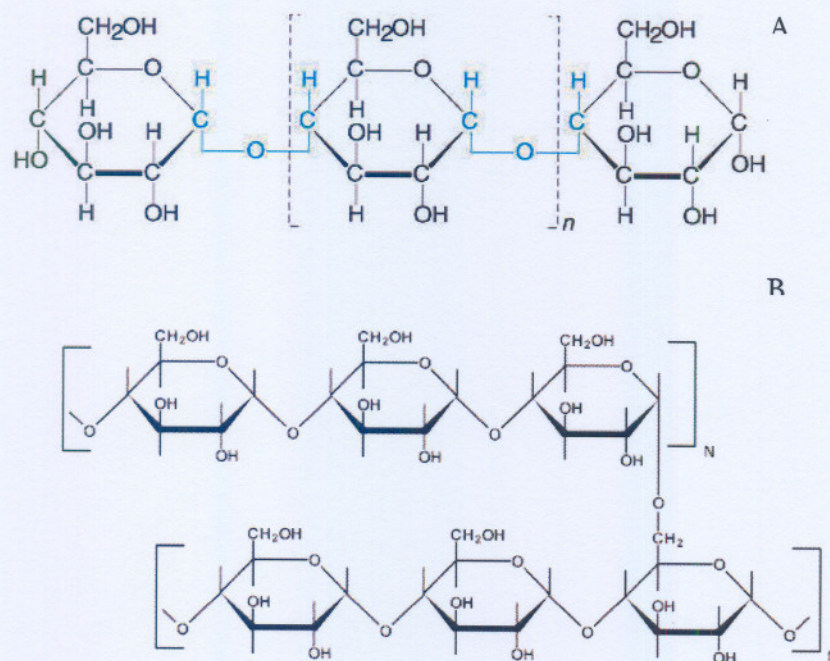
heterodisakkaried en maltotriose is 'n reduserende homotrisakkaried (Kennedy & White, 1983: 37).

Disakkariede is die eenvoudigste oligosakkaried en word in figuur 2.4.3 voorgestel. Tri- en tetrasakkariede kom minder in die natuur voor. 'n Paar van die laasgenoemde verbindings wat in die natuur voorkom, is raffinose (trisakkaried) en stagiöse (tetrasakkaried). Verder word oligosakkaried analoë in die farmaseutiese industrie as middels van terapeutiese intervensies gebruik (Lindhorst, 1999: 24 - 25).

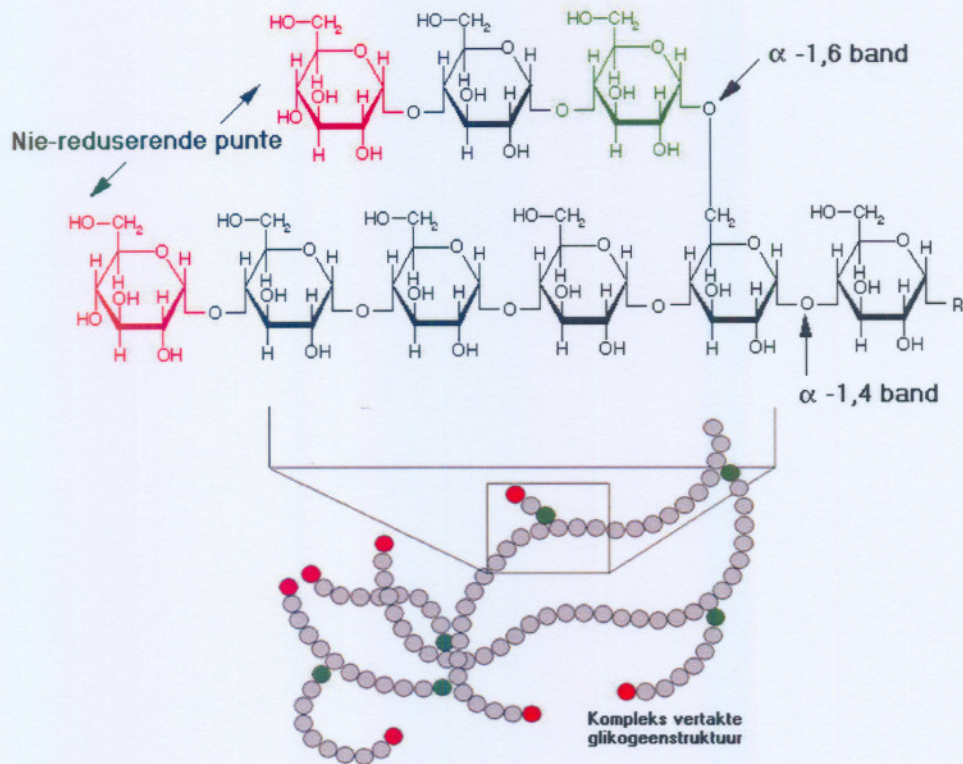


Figuur 2.4.3: Struktuur en voorkoms van disakkariede (Hopfer, 2002:1100).

Enkele van die biologiese belangrike polisakkariede in die groep word in figuur 2.4.4 en 2.4.5 voorgestel. Stysel vorm 'n groot deel van die mens se dieet en bestaan uit amilose sonder vertakkings. As vertakkings wel teenwoordig is, word die verbinding amilopektien genoem. 'n Tweede belangrike polisakkaried in die menslik liggaam is glikogeen. Die struktuur van glikogeen is minder liniêr as stysel en vertoon baie vertakkings (α 1-6 glikosidiese bande). Dit is die vorm waarin die menslike liggaam koolhidrate in die lewer en spiere kan stoor vir latere energiebehoefes (Voet en Voet, 1996:262).

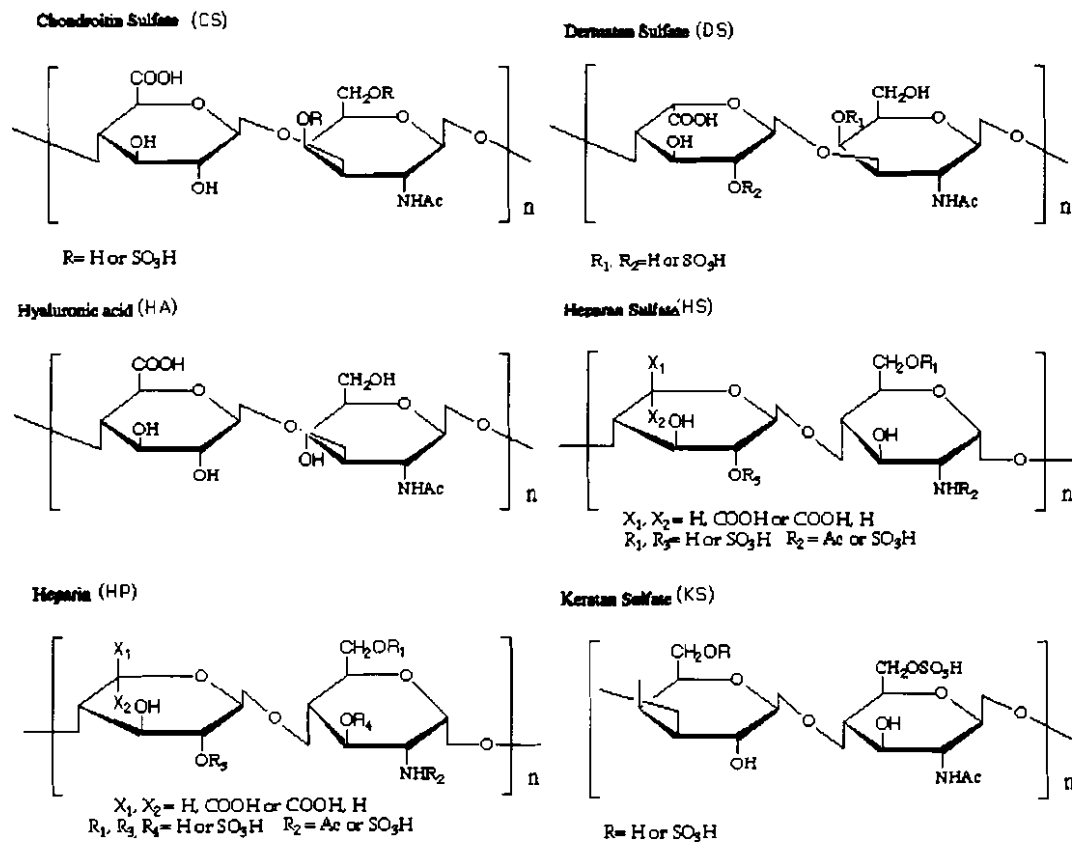


Figuur 2.4.4: Skematiese voorstellings van die A) basiese struktuur van stysel ($n > 10$) wat bestaan uit amilose en B) struktuur van amilopektien (Garrett & Grisham, 2005:221).



Figuur 2.4.5: 'n Skematiese voorstelling van die struktuur van glikoogeen (Voet en Voet, 1996:262).

Glikosamienglikane (mukopolisakkariede) is komplekse polisakkariede wat 'n belangrike biologiese rol in die menslike liggaam speel. Die verbinding is waarneembaar in die bindweefsel as elastien (byvoorbeeld in kraakbeen, vel en bloedvate) en vorm 'n fundamentele deel van proteoglikane (Voet & Voet, 1996:264). Glikosamienglikane is liniere kettings (heteropolisakkariede) van herhaalde disakkariede, waarvan monosakkaried eenhede uit aminosuikers en ander suikerderivate, met negatief gelaaiete sulfaat- of karboksielgroepe, bestaan. Figuur 2.4.6 stel die lewensbelangrike glikosamienglikane voor (Voet en Voet 1996:264).



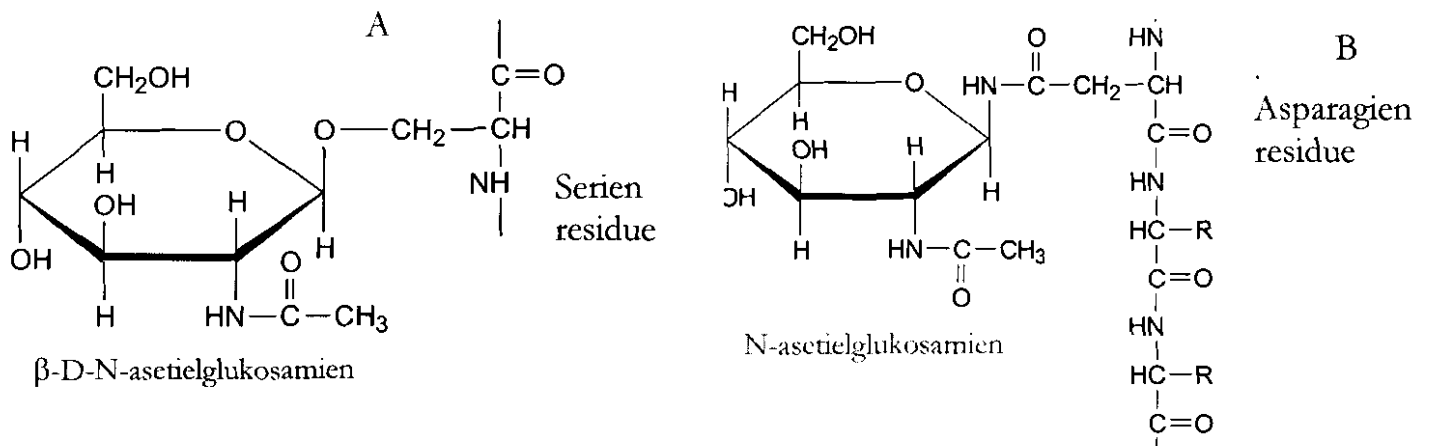
Figuur 2.4.6: Verskeie glikosaminoglikaan strukture. (Garett & Grisham, 2005:265).

Tabel 2.4.2: Belangrike glikosamienglikane in die menslike liggaam (Garett & Grisham, 2005:265).

Glikosamienglikaan	Voorkoms en funksie
Chondroitiensulfaat	Kom voor in kraakbeen en bindweefsel.
Heparien-sulfaat en heparan	Natuurlike antikoagulant – dus verhoed bloedklontvorming.
Hialuronaat	Kom verhoog voor in die oog en die sinoviale vloeistof waar dit as smeermiddel van die gewigte dien.
Dermatansulfaat	'n Komponent van die ekstrasellulêre matriks van die vel.

2.5 Proteoglikane (Glikoproteïne)

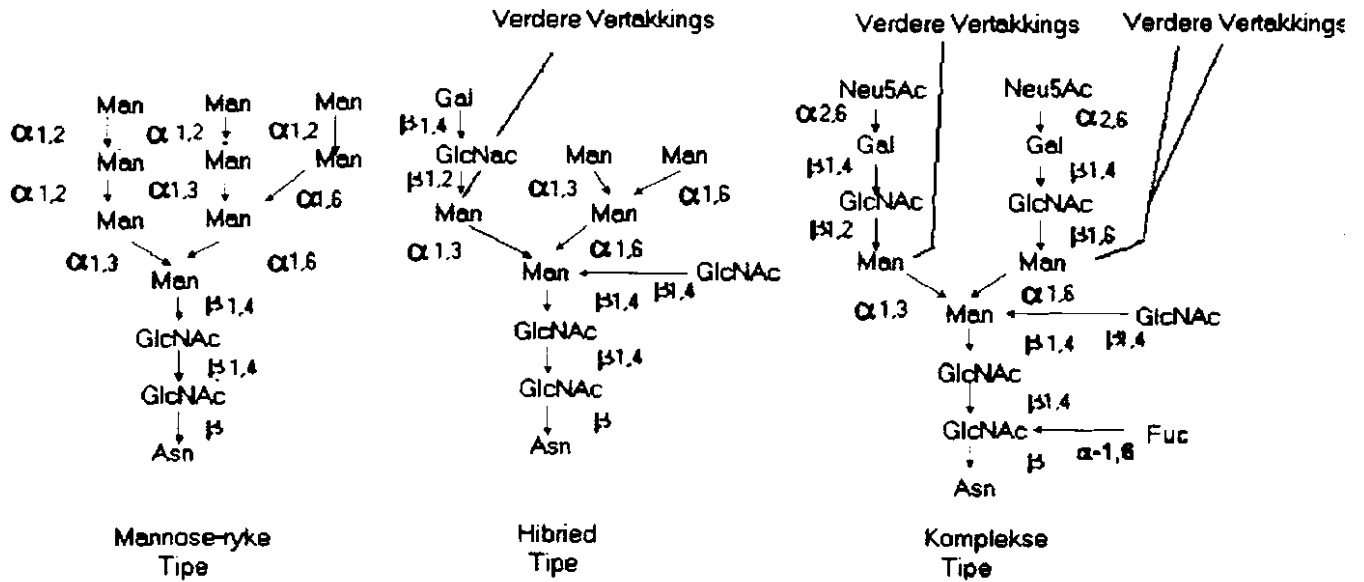
Proteïen en glikosamienglikane verbind kovalent en/of nie-kovalent om 'n diverse groep makromolekules naamlik proteoglikane (ook genoem glikoproteïne) te vorm. Min van die presiese funksie van die proteoglikane is tot dusver bekend. Die koolhidraatgroep kan via 'n hidroksielgroep van serien, treonien en hidroksie-lisien residu aan die polipeptied gekoppel word. Die molekule word dan 'n O-gekopplde oligosakkaried genoem en voorbeelde hiervan is mukine en leukosialin. Die O-gekopplde-oligosakkaried is ryk aan keratansulfaat en chondroitinsulfaat disakkariede. Die koolhidraatgroep kan ook via 'n amied stikstof van asparagien aan die polipeptied koppel en word 'n N-gekopplde oligosakkaried genoem (Garrette & Grisham, 2005:233). 'n Skematiese voorstelling van die twee groepe en die verskillende aminosure en monosakkariedbindings word in Figuur 2.5.1 weergegee.



Figuur 2.5.1 A) Die struktuur van O-gekopplde oligosakkaried, B) Die struktuur is 'n N-gekopplde oligosakkaried (Garett & Grisham, 2005:235).

Die O-gekopplde oligosakkariede is betrokke by seintransduksie prosesse en ensiemregulasie. Die N-gekopplde oligosakkariede se funksie is vaag in die literatuur, maar die strukturele eienskappe van die N-gekopplde oligosakkaried beïnvloed die funksionaliteit van glikoproteïne direk. Defekte in die biosintese en katabolisme van die N-

gekoppelde oligosakkariede (byvoorbeeld fukosidose en alfa-mannosidose) is al geïdentifiseer (Voet & Voet, 1995:266). Laasgenoemde oligosakkaried kom soms vertak in die liggaam voor. Figuur 2.5.2. stel die strukture van die molekule voor.



Figuur 2.5.2: Skematiese voorstelling van die verskeie vertakte strukture van N-gekoppelde oligosakkariede (Lindhorst, 1999:158).

Hoofstuk 3

Koolhidraatmetabolisme en defekte van die koolhidraatmetabolisme

3.1 Inleiding

Die omvang van die koolhidraatmetabolisme is van so 'n aard dat 'n gedetailleerde literatuurstudie, wat genetiese inligting en ensiemstruktuur en ensiemregulering insluit, nie moontlik is in die verhandeling nie. Die doel van die studie is om 'n metode te ontwikkel wat vir die identifikasie van die mees bekende defekte van die koolhidraatmetabolisme aangewend kan word en wat in die toekoms moontlik gebruik kan word om onbekende defekte te identifiseer. Om dié rede is die literatuurstudie sodanig uitgevoer dat die noodsaaklike inligting om die doel te bereik, verkry kan word.

Die metabolisme kan gedefinieer word as 'n groep chemiese prosesse, in lewende organismes, waar biomolekules betrokke is. Die resultaat hiervan is groei, generasie van energie, eliminerings van afval en ander liggaamsproesse wat die verspreiding van nutriënte na die bloed en die res van die liggaam bewerkstellig. Die metabolisme kan in twee prosesse verdeel word, naamlik: Die anabolisme (konstruktiewe fase - waar biomolekules vervaardig word) en katabolisme (destruktiewe fase - waar komplekse biomolekules (glikogeen) na eenvoudige molekules (glukose) omgeskakel word (Anderson, 2002:1085).

Die katalisators van die chemiese reaksies, is ensieme. Die werking van die ensieme word beïnvloed deur 'n persoon se genetiese samestelling, vitamien en minerale sowel as ander eksterne faktore (skok of stres). Die verlaagde of defektiewe werking van ensieme mag resulteer in 'n metaboolse defek of afwyking. Die defek of afwyking resulteer in verlies van die homeostase in die liggaam. 'n Kenmerkende patofisiologiese disfunksie word waargeneem. In sommige gevalle kan 'n kliniese korrelasie ten opsigte van die defekte gemaak word (Anderson, 2002:1085).

3.2 Koolhidraatmetabolisme

3.2.1 Vertering

Stysel, 'n polisakkaried, verskaf ongeveer 50% van die verteerbare koolhidrate in die Westerse dieet. Sukrose en laktose is van die belangrikste disakkariede met 'n hoë voorkoms in dieet. Kleiner hoeveelhede trehalose en vrye fruktose, 'n monosakkaried, kom ook voor. Groot hoeveelhede nie-verteerbare koolhidrate kom in die dieet voor (byvoorbeeld stagiöse en raffinose). (Vander *et al.*, 1999:560).

3.2.1.1 Polisakkariedvertering

Stysel is 'n mengsel van twee tipes polisakkariede, naamlik: amilose met 1-4- α -gebonde glukose eenhede en amilopektien met 1-4- α -glikosidiese bindings en 1,6- α -glukosidiese vertakkings. Stysel word verteer deur 'n verskeidenheid amilose ensieme, wat insluit, speekselamilase sowel as pankreasamilase (Tabel 3.2.1.1.1). Die amiloliese reaksie word beskryf as 'n endohidrolise van 1,4- α -D-glukosidiese bindings in polisakkariede wat drie of meer 1,4- α -gebonde D-glukose eenhede bevat. Die produkte van amilose is styselselfragmente wat ook as malto-oligosakkariede (maltose en maltotriose) bekendstaan, terwyl amilopektien ook vertakteketting dekstriene lewer. Intestinale bakterieë lewer ook 'n bydrae tot die vertering van koolhidrate. Produkte soos asynsuur, propioonsuur en bottersuur, wat as bakteriële produkte gelewer word, kan volledig geabsorbeer word (Sair. 2005).

Die produksie van pankreasamilase geskied eers ná geboorte. Net na geboorte is daar bykans geen pankreasamilase aktiwiteit in die duodenale vloeistof waarneembaar nie. Die indusering van die produksie van pankreasamilase geskied ongeveer een maand ná geboorte deur cholestokininien, sekretien en styselinnome. As gevolg van die afwesigheid van amilase, is die vertering van amilopektien in babas onder 6 maande onvolledig en dekstriene met soveel as 30 glukose eenhede kom in die dunderm lumenale vloeistof voor (Sair. 2005).

Ten spyte van die lae aktiwiteit van speeksel- en pankreasamilase kan babas steeds beduidende hoeveelhede stysel goed verteer en absorbeer. Hierdie vertering kan waarskynlik toegeskryf word aan glikoamilase aktiwiteit wat 'n groter rol speel. Bakteriële vertering van die dekstriene mag ook 'n bydrae lewer.

Vertraagde ontwikkeling van pankreasamilase vrystelling, veral by premature babas, kan lei tot wanvertering van stysel. Aangebore defekte van die pankreasamilase 2A (Amy2A) is beskryf.

Tabel 3.2.1.1.1: Ensieme betrokke by die vertering van koolhidrate (Sair. 2005).

Reaksie	Substraat	Ensiem	Produk
Vertering	Stysel	amilase, α 1A; speeksel [EC:3.2.1.1]	Dekstriene
Vertering	Stysel	amilase, α 1B; speeksel [EC:3.2.1.1]	Dekstriene
Vertering	Stysel	amilase, α 1C; speeksel [EC:3.2.1.1]	Dekstriene
Vertering	Stysel	amilase, α 2A; pankreatiese [EC:3.2.1.1]	Dekstriene
Vertering	Stysel	amilase, α 2B; pankreatiese [EC:3.2.1.1]	Dekstriene
Vertering	Stysel	lisosiem-agtige 1 [EC:3.2.1.1]	Dekstriene

3.2.1.2 Oligosakkariedvertering

Vertering van disakkariede en sommige oligosakkariede word uitgevoer deur 'n aantal epiteelselmembraan gebonde ensieme: sukrase-isomaltase, laktase phlorizinhidrolase, maltase-glikoamilase en trealase.

3.2.2 Absorpsie en distribusie van monosakkariede

Twee prosesse, naamlik transellulêre en parasellulêre transport, is betrokke by die absorpsie van verbindings vanuit die intestinum. Eersgenoemde is die beweging van nutriënte oor epiteelselmembrane na die bloed. Die proses kan met verskeie transportsisteme geskied, byvoorbeeld gefasiliteerde diffusie en primêre- en sekondêre

aktiewe transport. Parasellulêre transport is die beweging van nutriënte tussen die epiteelselle deur. Die proses geskied deur normale diffusie van hoë- na lae nutriëntkonsentrasies (Miller, 2002:3). Die integriteit van die epiteelmembrane speel hier vanselfsprekend 'n belangrike rol. Beide die meganismes is betrokke by die absorpsie van koolhidrate vanuit die dunderm.

Sellulêre opname van monosakkariede is afhanklik van monosakkaried transportproteïene. Twee klasse transportproteïene kom voor, naamlik die natrium-afhanklike glukosetransporters (SGLT) en glukose-transporters (GLUT). Transportproteïene (Tabel 3.2.2.1) is weefsel-spesifiek, maar verteenwoordigers van beide families word dikwels in weefsel aangetref. Vele reguleringsmeganismes (onder andere hormonale regulering en substraatregulering) kom voor (Hopfer, 2002:1100).

Tabel 3.2.2.1: Transportproteïene betrokke by die absorpsie en distribusie van koolhidrate (Hopfer, 2002:1100 en Sair, 2005).

Transporter	Klas	Weefsel	Insulien sensitief	Funksie
Natrium-afhanklike glukose transporters				
SGLT1		Intestinum, niere		Glukose, Galaktose
SGLT2		Niere		Glukose
SGLT3 tot 6?				
Glukose Transporter				
GLUT1	I	Eritrosiete, brein, spiere, witvetweefsel	Nee	Glukose
GLUT2	I	Lewer, pankreas, intestinum, niere	Nee	Glukose, Fruktose, Galaktose
GLUT3	I	Brein, witvetweefsel	Nee	Glukose
GLUT4	I	Hart, spiere, witvetweefsel, bruinvetweefsel, brein	Ja	
GLUT5	II	Intestinum, niere, testis, witvetweefsel, spiere	Nee	Fruktose, Glukose
GLUT6	III	Brein, milt, leukosiete		Glukose
GLUT7	II	Onbekend	Onbekend	
GLUT8	III	Testis, brein, spiere,	Ja in	Glukose

		witvetweefsel, ander weefsel	blastosiete	
GLUT9	II	Lewer, niere	onbekend	Onbekend
GLUT10	III	Lewer, pankreas, spiere	onbekend	Glukose
GLUT11	II	Hart, spiere	Nee	Fruktose, Glukose
GLUT12	III	Hart, prostaat, spiere, intestinum, witvetweefsel	Ja	Onbekend
HMIT	III	Brein, witvetweefsel	onbekend	Mio- inositol

Dit is dus duidelik dat beide transportproteïne sowel as die integriteit van die selle (veral epiteelselle in die intestinum), tot wanabsorpsie en abnormale distribusie van koolhidrate kan lei. Verskeie aangebore defekte van die koolhidraattransportproteïne is bekend (Tabel 3.2.2.2).

Tabel 3.2.2.2: Aangebore defekte van die monosakkariedtransporters (Sair. 2005)

Defek	Transporteur	Weefsel
Kongenitale glukose/galaktose wanabsorpsie	SGLT1	Intestine / Niere
Renale glukosurie	SGLT2	Niere
Glukose-transporterproteïnsindroom	GLUT1	Bloedbreinskans / Eritrosiete / Ander weefsel
Fanconi-Bickel sindroom	GLUT2	Lewer / Niere / Pankreas β -selle / Intestinum
Diabetes	GLUT4	Spiere/ Vetweefsel

Diabetes bestaan uit 'n komplekse groep defekte, maar vir die doel van die studie sal die defekte nie afsonderlik behandel word nie. Met die uitsondering van glukose-transporterproteïnsindroom word monosakkariede (glukose en galaktose) in verhoogde konsentrasies in die uriene van pasiënte met defekte van die monosakkariedtransporters uitgeskei. Die glukose-transporterproteïnsindroom vertoon verlaagde konsentrasies glukose in die serebrospinale vog. In Tabel 3.2.2.3 word die kenmerkende roetine en spesiale analitiese resultate van bogenoemde defekte weergegee.

Tabel 3.2.2.3: Abnormale koolhidrate by defekte van die transportproteïne (Sair. 2005)

Defek	Siftingstoetse	Koolhidraatanalise			
	<i>Reduserende stowwe</i>	<i>Uriene</i>	<i>Bloed</i>	<i>SSV</i>	<i>Stoelgang</i>
Kongenitale glukose/galaktose wanabsorpsie	Uriene (+)	Glukose, galaktose (+)	Normaal		Glukose, galaktose (+)
Renale glukosurie	Uriene (+ tot +++)	Glukose (++)	Normaal		Normaal
Glukose-transporterproteïen-sindroom	Uriene (-)	Normaal	Normaal	Glukose (-)	Normaal
Fanconi-Bickel sindroom	Uriene (++++)	Glukose (++) galaktose (+) galaktitol (+) sorbitol (+)	Vastend glukose (-) na voeding (+)		Glukose, galaktose (+)
Diabetes	Uriene (+++++)	Glukose (+++++)	Glukose (+++++)		Normaal

3.2.3 Metabolisme van monosakkariede

Monosakkariedmetabolisme sluit die volgende weë in: glikolise, glukoneogenese, galaktosekatabolisme en -anabolisme, fruktosekatabolisme, mannosekatabolisme en -anabolisme, fukosekatabolisme en -anabolisme, suikeramienmetabolisme en inositolmetabolisme. Die metabolisme betrokke by bogenoemde weë sal vervolgens bespreek word.

3.2.3.1 Glikolise en glukoneogenese

Die primêre rol van die glukosekatabolisme deur middel van die glikoliseweg (Figuur 3.2.3.1.1) is die produksie van energie. Die weg speel ook 'n rol in die anabolisme van verskeie ander molekules. Glukoneogenese speel 'n belangrike rol in die handhawing van bloedglukose konsentrasies en die opbou van glikogeen (Garrett & Grisham, 2005: 578). Katabolisme van glukose na pirovaat vind in elke sel van elke tipe weefsel plaas. In sommige weefsel soos rooibloedselle en breinweefsel, speel die glikoliseweg 'n groter rol omrede die weefsels nie van ander voedingstowwe as energiebron gebruik maak nie.

Verskeie defekte van die glikolise- en glukoneogenese ensieme en iso-ensieme is bekend, alhoewel die defekte meer seldsaam as defekte van byvoorbeeld vetsuurkatabolisme is. Verskeie redes kan as verklaring dien vir die lae voorkoms van die defekte. Die belang van die glikoliseweg kan moontlik daartoe bydra dat pasiënte met die defekte nie lewend gebore word nie. Die defekte kan moontlik wel voorkom, maar onopspoorbaar wees met tegnieke wat tans gebruik word. Die voorkoms van iso-ensieme dra daartoe by dat 'n spesifieke reaksie van die glikoliseweg soms in slegs een weefseltipe abnormaal sal wees. Substrate wat ophoop, sal dus deur die glikolise van ander weefseltipes afgebreek word en geen of baie min van die substraat sal teen abnormale konsentrasies in liggaamsvloeistowwe voorkom (Kanehisa Laboratories, 2005).

Meer as een iso-ensiem word dikwels in dieselfde weefseltipe aangetref en dus sal 'n defek nie die spesifieke stap van die glikoliseweg totaal stop nie. In sulke gevalle mag die regulering wel geraak word, wat wel aanleiding tot kliniese simptome kan gee. Tans is bekende defekte van die glikoliseweg bykans uitsluitlik beperk tot rooibloedselle. Omrede volwasse rooibloedselle nie mitochondria bevat nie, is die selle meer afhanklik van anaërobiese glikolise as die res van die liggaam. As gevolg hiervan, lei defekte van die glikoliseweg dikwels tot hemolitiese anemie, wat maklik opgespoor is as gevolg van die teenwoordigheid van hematurie en verhoogde bilirubienuitskeiding. Rooibloedselle (anders as brein-, lewer- en selfs spierselle) is ook maklik bekombaar en ensiemtoetse kan aangewend word in bevestiging van die defekte. Die voorkoms van defekte van rooibloedselglikolise dui egter daarop dat die weg ook in ander weefsel mag voorkom en opgespoor sal word, indien die tegnologie daartoe in staat is (Kanehisa Laboratories, 2005).

Ensieme betrokke by die glikoliseweg (weefsel spesifieke isosieme en bekende defekte) word in Tabel 3.2.3.1.1 weergegee.

Tabel 3.2.3.1.1: Glikoliseweg ensieme, isosieme en bekende defekte (McKusick, 2005)

Ensiem	Isosiem	Weefsel	Defek
Heksokinase (HK)	HK1	Rooiselle?	HK hemolitiese anemie?
	HK2	Spiere	
	HK3	Witselle	
	HK4 (Glukokinase)	Lewer, β -sel- le van pan- kreas	Tipe 2 diabetes mellitus
	Rooi sel HK	Rooiselle	HK hemolitiese anemie
Galaktosemutarotase (GALM)	GALM	onbekend	Onbekend
Glukosefosfaatisomerase (GPI)	GPI	onbekend	Kroniese hemolitiese anemie a.g.v. GPI defek (Dacie Tipe 1)
Fosfofruktokinase (PFK)	PFK(M)4	Spiere	Glikogeenstoringsdefek VII
	PFK (L)4	Lewer, niere	Klassieke PFK met miopatie en hemolise, 4 Nie- klassieke tipes
	PFK(L)4-(M)4	Rooi selle	Klassieke PFK met miopatie en hemolise
	PFK(P)4- (P)2(L)2	Bloedplaatjies	
	PFKX	onbekend	
Fruktose bifosfaat- aldolase (ALDO)	ALDOA	Embrio, brein, volwasse spiere, intestine	ALDOA-defek met hemolitiese anemie
	ALDOB	Volwasse lewer, niere	Fruktose intoleransie
	ALDOC	Brein	
Triosefosfaatisomerase (TPI)	rcTPI1	Rooiselle	
	TPI1	Rooiselle, limfosiete	Nie-sferiese hemolitiese anemie I
	TRI2	onbekend	
Gliseraldehyd-3- fosfaatisomerase (GAPD)	GAPD		Speel 'n rol in neuronale apoptose (Alzheimer en Huntington se siekte)
	GAPDS	Spermatoos	
3-Fosfogliseraatkinase (PGK)	PGK1 of A (X- gekoppel	Rooiselle, spiere, ?	PGK-kinase defek met (1) hemolitiese anemie, met (2) miopatie, met (3) gemengde beeld

	PGK2 of B	Spermatosoa	
Asielfosfatase	ACYP1	Rooiselle	
	ACYP2	Spiere	
3-Fosfoglisieromutase (PGAM)	PGAM1	Rooiselle, lewer, brein	
	PGAM2	Spiere, hart	PGAM-defek
	PGAM4	onbekend	
	BPGM	onbekend	Hemolitiese anemie en polisistemia a g v BPGM-defek
Endolase (ENO)	ENO1 of (α)	Meeste weefsel	ENO-defek
	ENO2 of (β)	Senuweefsel	
	ENO3 of (γ)	Spiere	
Pirovaatkinase (PK)	PKLR	Lewer, rooiselle	PK-defek
	PKM2	Spiere, hart, brein	
	PKM1	Vroeë fetale weefsel	
Laktaatdehidrogenase (LDH)	LDHA6A	onbekend	
	LDHA	Spiere	LDH-defek met mioglobienurie
	LDHB	Hart	LDHB-defek
	LDHC	Spermatosoa	
	LDHAL6B	onbekend	
Glukoneogenese			
Fruktose-1,6-bifosfatase (FBP)	FBP1	Lewer	FBP1-defek met laktaatasidose en hipoglisemie
	FBP2	Spiere	

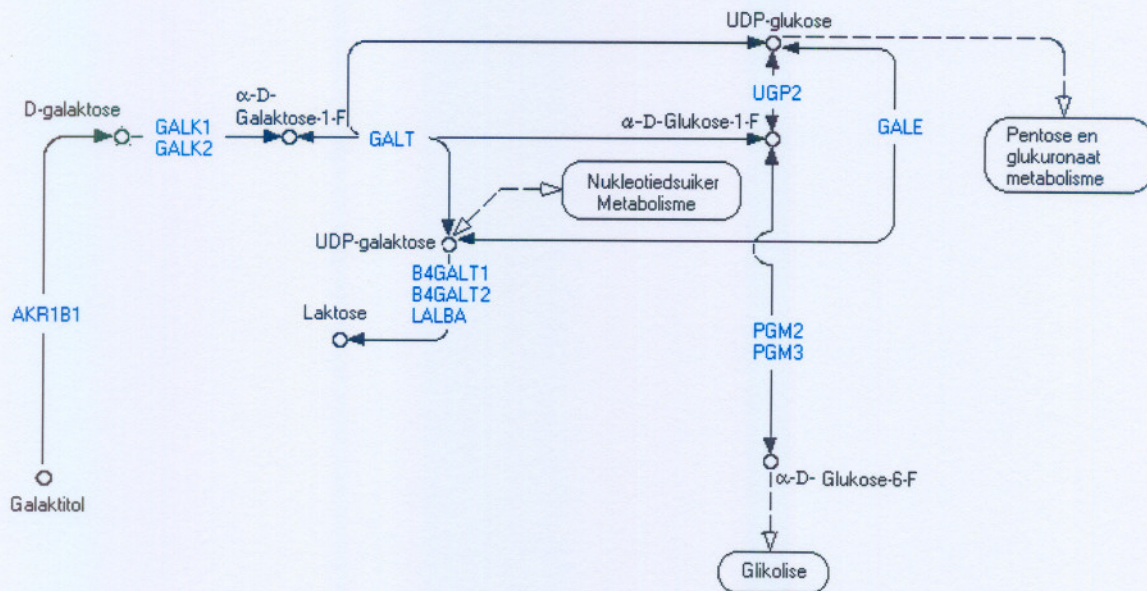
Defekte van die glikoliseweg ensieme word selde opgespoor en beskryf. Dit kan toegeskryf word aan die gebrek van uitskeiding van abnormale metaboliete in die uriene van pasiënte en ook 'n gebrek aan tegnieke om die fosfo-esters van koolhidrate te analiseer. Die meeste aangebore defekte van die glikoliseweg, wat tans bekend is, gee aanleiding tot hemolitiese anemie en spierafbraak en derhalwe mioglobienurie, hematurie (wat sekondêr tot verhoogde bilirubien lei) en ander metaboliete, soos p-hidroksifenielasynsuur, wat met lewerbeskadiging gepaard gaan (Martinov *et al*, 2000:75). Met die uitsondering van glukokinasedefek, wat aanleiding tot verhoogde urinêre glukose gee, kan die analyses van

koolhidrate nie 'n groot bydrae tot die identifikasie van die defekte lewer nie. Die analises van monosakkaried fosfo-esters in die bloed mag in dié geval baie waardevol wees. Hierdie tegniek is onlangs gepubliseer deur Wamelink *et al* (2005:18) en aangewend vir die opsporing van pentosefosfaat weg defekte, maar tot op hede is dit nog nie algemeen toegepas in die opsporing van glikoliseweg defekte nie (Kanehisa Laboratories, 2005).

3.2.3.2 Galaktosemetabolisme

Laktose (wat bestaan uit galaktose en glukose) word as die belangrikste voedselbron van babas beskryf. Om dié rede word die ondersoek van die metabolisme gewoonlik tot babas beperk. Galaktose het egter 'n baie wyer voorkoms in die natuur as wat vermoed word. 'n Galaktose polimeer galaktan kom in 'n wye verskeidenheid van voedsel met 'n plantaardige oorsprong voor by onder andere patats en sojabone. Daar is reeds baie gespekuleer oor die voordele van die voorkoms van galaktose in laktose en hoewel dit wil voorkom of die afwesigheid van galaktose in 'n baba se voeding nie 'n groot verskil maak nie, is dit duidelik uit die metabolisme dat galaktose waarskynlik kan bydra tot die aanvulling van glikogeen. Die eindproduk van galaktosekatabolisme is UDP-glukose wat die begin is van glikogeenanabolisme (Segal *et al.*, 2006:99).

Galaktosemetabolisme is van groot belang vir Suid-Afrika en dus ook vir die studie daarvan. Die voorkoms van defekte van die galaktosemetabolisme blyk besonder hoog te wees (Henderson *et al.*, 2002:5). Die ernstige gevolge van die defekte en suksesvolle behandelbaarheid met behulp van 'n lae galaktose inname, dra verder by tot die belang van die opsporing van kinders met die defekte (Segal, 1995:984-986). 'n Voorstelling van die galaktosemetabolisme sowel as die betrokke ensieme word in figuur 3.2.3.2.1 en tabel 3.2.3.2.1 weergegee.



Figuur 3.2.3.2.1: Voorstelling van die galaktosemetabolisme (Kanehisa Laboratories, 2005).

Tabel 3.2.3.2.1: Ensieme, isosieme en defekte van die galaktose katabolisme (McKusick, 2005).

Ensiem	Isosieme	Weefsel	Defekte
Galaktokinase (GALK)	GALK1	onbekend	Galaktosemie Tipe II
	GALK2	Moontlik GalNAc-kinase	
Galaktose-1-fosfaat-uridieltransferase (GALT)	GALT	onbekend	Klassieke Galaktosemie
UDP-galaktose-4-epimerase (GALE)	GALE	onbekend	GALE-defek
Aldo-keto-	AKR1B1	onbekend	

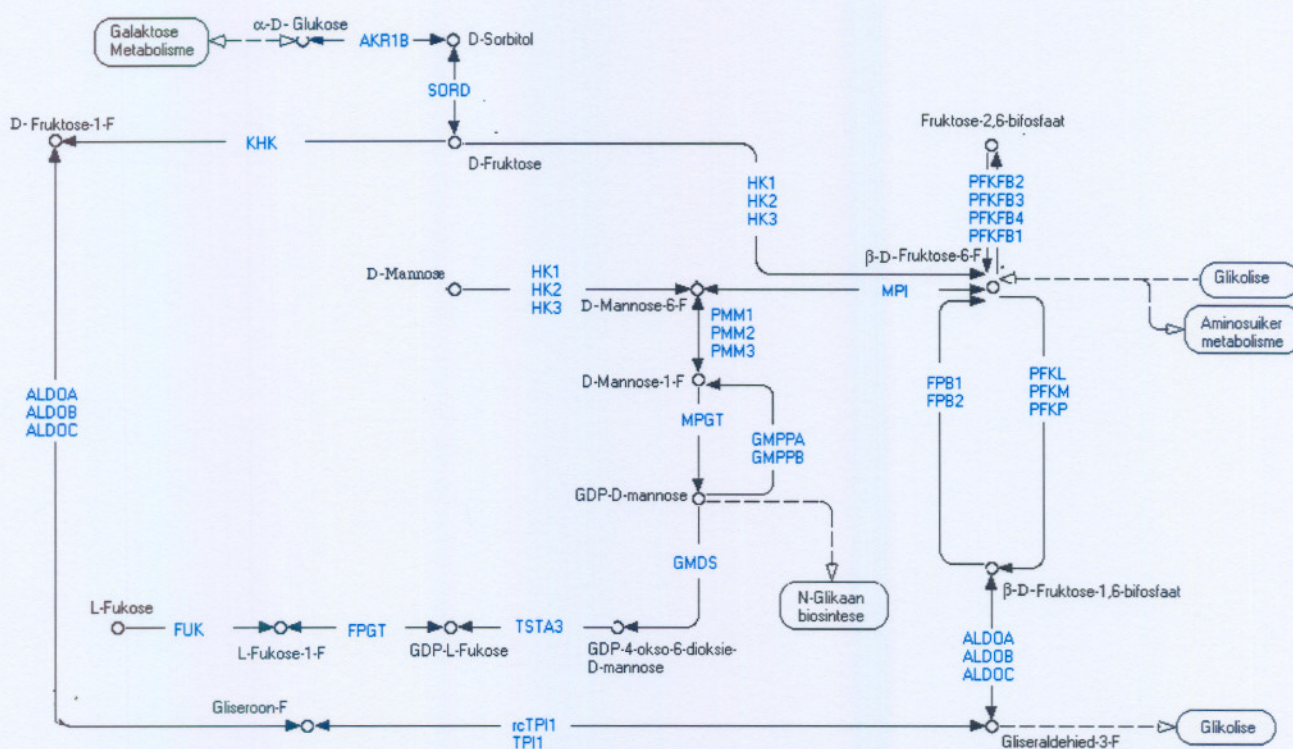
reduktase (AKR)			
UDP-glukose pirofosforilase 2 (UGP2)	UGP2	onbekend	
Phosfoglukomutase (PGM)	PGM2	onbekend	
	PGM3	onbekend	
UDP-Gal: β GlcNAc β 1,4- galaktosiel- transferase (B4GALT)	B4GALT1	Proteïne vorm saam laktosesintase	
	B4GALT2		
α -Laktalbumien (LALBA)	LALBA		

Anders as in die glikoliseweg is daar min isosieme in die galaktosemetabolisme teenwoordig. Hoewel daar nie met sekerheid gesê kan word dat die defekte om hierdie rede ernstiger fenotipes vertoon nie, kan met sekerheid gesê word dat hulle wel as gevolg hiervan makliker opspoorbaar is. Defekte van die galaktosemetabolisme lei sonder uitsondering tot ophoping van galaktose in die uriene wat gewoonlik gepaard gaan met verhoogde galaktitol konsentrasies. Galaktitol, wat moontlik 'n rol speel in die hidrostatiese druk binne die sel, dra by tot simptome soos katarakte. Die GALT en GALE defekte word ook gekenmerk aan lewerskade met gevolglike teenwoordigheid van sekondêre metaboliete wat in die uriene waarneembaar is (Segal, 1995:984-986).

3.2.3.3 Fruktose-, mannose- en fukosemetabolisme

Die hoofbron van fruktose in die mens se dieet, is waarskynlik sukrose, hoewel vrye fruktose en 'n fruktose polimeer, *fruktaan*, ook in die natuur aangetref word. Mannose

kom wel in die natuur voor, maar die grootste hoeveelheid word self gesintetiseer (Gitzelmann *et al.*, 1995:915). 'n Voorstelling van die fruktose-, fukose- en mannosemetabolisme word in Figuur 3.2.3.3.1 weergegee. Die ensieme betrokke by die fruktose- en mannose- metabolisme word in Tabel 3.2.3.3.1 weergegee.



Figuur 3.2.3.3.1: Fruktose-, mannose- en fukosemetabolisme (Kanehisa Laboratories, 2005).

Tabel 3.2.3.3.1: Ensieme, isosiem en defekte van die fruktose-, mannose- en fukose-metabolisme (McKusick, 2005).

Ensiem	Isosiem	Weefsel	Defekte
<i>Fruktosemetabolisme</i>			
Sorbitoldehidrogenase (SORD)	SORD	Onbekend	SORD-defek met katarakte
Fruktokinase (KHK)	KHK	Lewer, pankreas	Fruktosurie
Fruktose-bifosfaataldolase (ALDO)	ALDOA	Sien Tabel	Sien Tabel
	ALDOB	3.2.3.1.1	3.2.3.1.1
	ALDOC		
Trisoefosfaatisomerase (TPI)	rcTPI1	Sien Tabel	Sien Tabel
	TPI1	3.2.3.1.1	3.2.3.1.1
Heksokinase (HK)	HK1	Sien Tabel	Sien Tabel
	HK2	3.2.3.1.1	3.2.3.1.1
	HK3		
6-Fosofrukto-2-kinase/fruktose-2,6-bifosfatase (PFKFB)	PFKFB1 (X-chromosoom)	Lewer/Spiere	
	PFKFB3	Plasenta	
	PFKFB4	Testis	
6-Fosofrukto-2-kinase	PFKFB2	Hart	
6-Fosofruktokinase	PFKL	Lewer	
	PFKM	Spiere	
	PFKP	Bloedplaatjies	
Fruktose-1,6-bifosfatase	FBP1	Lewer, leukosiete	Fruktose-1,6-bifosfatase defek

	FBP2	Spiere	
<i>Mannosemetabolisme</i>			
Mannosefosfaatisomerase	MPI	Onbekend	CDG tipe Ib
Heksokinase (HK)	HK1	Sien Tabel 3.2.3.1.1	Sien Tabel 3.2.3.1.1
	HK2		
	HK3		
Fosfomanomutase (PMM)	PMM1	Lewer/Hart/ Brein/Pankreas/ Spiere	
	PMM2	Onbekend	CDG tipe Ia
	PGM2	Onbekend	
Mannose-1- fosfaatguaniltransferase	(MPGT)	Onbekend	
GDP-mannose- pirofosforilase (GMPP)	GMPPB	Onbekend	
	GMPPA	Onbekend	
GDP-mannose-4,6- dehidratase	GMDS	Onbekend	
<i>Fukosemetabolisme</i>			
GDP-L-fukose sintase (weefsel-spesifieke oorplant antigeen P35B)	TSTA3	Onbekend	
Fukose-1- fosfaatguaniltransferase	FPGT	Onbekend	
Fukokinase	FUK	Onbekend	

Hoewel daar ooreenkomste tussen die *fruktose katabolisme* en galaktose katabolisme is, lei defekte van die fruktosemetabolisme gewoonlik tot minder ernstige kliniese simptome. Verskeie redes kan vir dié tendens aangevoer word, maar die belangrikste bydraende faktor kan toegeskryf word aan die afwesigheid van fruktose in babavoeding. Sukrose word

meestal eers op 'n hoër ouderdom ingeneem op welke tyd die peuters met fruktose-metabolisme defekte aversie vir soet smaak ontwikkel. Onbewustelik word behandeling dus reeds op die stadium toegepas. Twee defekte van die fruktosemetabolisme is bekend, naamlik fruktosurie (FK-defek) en aangebore fruktose intoleransie (ALDOB-defek) (Gitzelmann, *et al*, 1995:915). Fruktosurie is meestal simptoombloos en word toevallig opgespoor deur middel van reduserende stowwe wat positief in uriene voorkom. Aangebore fruktose intoleransie kan baie ernstige simptome veroorsaak. Kinders met dié defek ontwikkel 'n aversie vir soet smake, is ondervoed en ondervind vertraging in hul groei-prosesse. Die vermyding van suiker deur pasiënte dra egter daartoe by dat die chemiese diagnostiek vals negatiewe resultate kan lewer. Fruktose toleransietoetse kan die probleem oorkom, maar moet onder uiters gekontroleerde toestande uitgevoer word om hipoglisemie te monitor (Duran, *et al*, 1996:290).

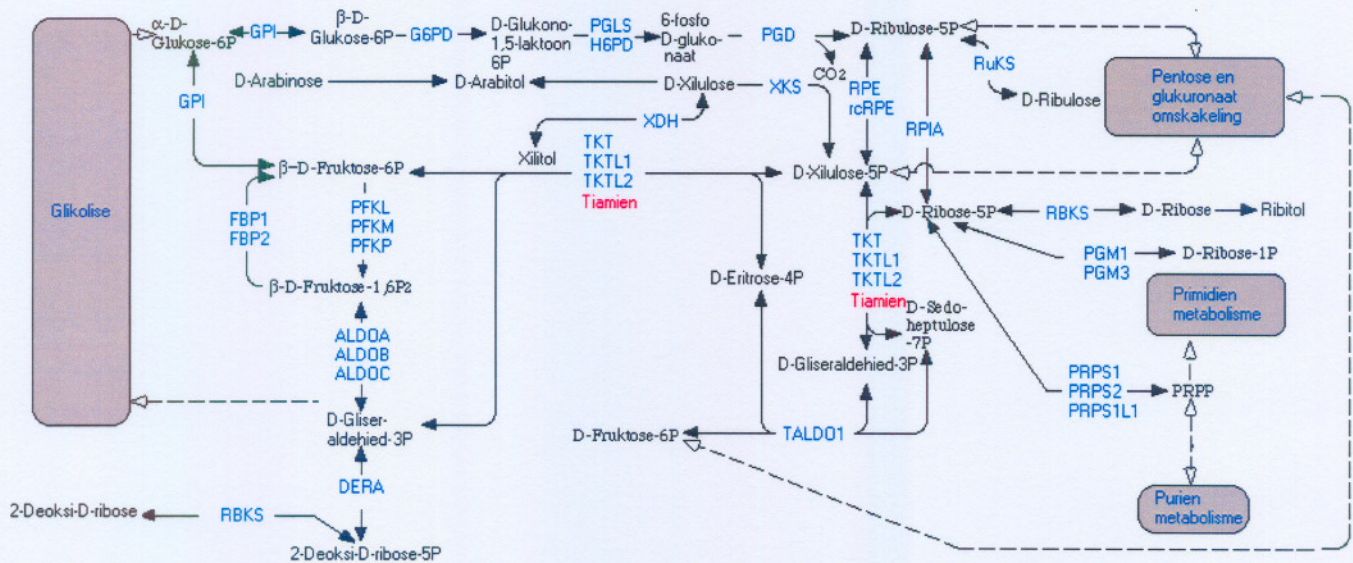
Bekende defekte van die *mannosemetabolisme* lei tot die vorming van abnormale glikane en glikoproteïene. Hierdie defekte staan bekend as koolhidraatdefektiewe-glikoproteïene (CDG) en word hoofsaaklik deur die analyses van transferrië met behulp van isoelektriese fokusering gediagnoseer. Potensieel kan die analyses van mannose en mannosefosfaatesters aangewend word vir die opsporing van die defekte (Yamashita, 1993:5784).

Fukose is teenwoordig in glikoproteïene sowel as glikolipiede en is betrokke by bloedgroep antigeen erkenning, inflammasie en metastasis. Die moontlikheid word genoem dat defekte van die fukosemetabolisme betrokke mag wees by CDG Tipe IIc wat gekenmerk word aan die gebrek in rooisel H-antigeen, hoewel direkte bewyse tans nog ontbreek (Lindhorst, 2000:184). Urinêre *fukose* word selde in uriene waargeneem en kan meestal as disakkariede of trisakkariede as die afbraakprodukt van glikane opgespoor word in die uriene. Die analyses van fukose-esters sal waarskynlik ook meer lig kan werp op potensiële defekte van die metabolisme.

3.2.3.4 Pentosefosfaatweg

Die pentosefosfaatweg word as 'n anaboliese weg beskou. Hoofsaaklik 3 produkte word gevorm naamlik: NADPH wat noodsaaklik is vir biosintese prosesse, glikoliseweg

intermediêre, wat indirek bydra tot energieproduksie en ribose-5-fosfaat wat noodsaaklik is vir DNA en RNA sintese (Garrett & Grisham, 2005:725). 'n Skematiese voorstelling van die weg sowel as die betrokke ensieme word in Figuur 3.2.3.4.1 en tabel 3.2.3.4.1 gegee.



Figuur 3.2.3.4.1: Skematiese voorstelling van die reaksies van die pentosefosfaatweg (Kanehisa Laboratories, 2005).

Tabel 3.2.3.4.1: Ensieme, isosiem en defekte van die pentosefosfaatweg (McKusick, 2005).

Ensiem	Isosiem	Weefsel	Defek
Glukose-6-fosfaatisomerase (GPI)	GPI	Onbekend	Kroniese hemolitiese anemie
Glukose-6-fosfaatdehidrogenase (G6PD)	G6PD	Onbekend	G6PD-anemie (zenobiotika sensitiewe anemie, malaria weerstandbiedend)

6-Fosfoglukono-laktonase (PGLS)	PGLS	Onbekend	
Heksose-6-fosfaatdehidrogenase (H6PD)	H6PD	Lewer/niere/leukosiete	Kortisoon reductase defek
Fosfoglukonaatdehidrogenase (PGD)	PGD		X-gekoppelde PGD-defek
Ribulosefosfaat-3-epimerase (RPE)	rcRPE	Rooiselle	
	RPE	Onbekend	
Ribose-5-fosfaatisomerase (RPIA)	RPIA	Onbekend	RPI-defek
Transketolase (TKT)	TKT1	Onbekend	Wernicke-Korsakoff sindroom
	TKTL1	Onbekend	
	TKTL2	Onbekend	
Ribokinase	RBKS	Onbekend	
Fosfoglukomutase (PGM)	PGM1	Onbekend	
	PGM3	Verhoog in die lewer, pankreas, lewer – nie in longe nie.	
Fosforibosielpirofosfaatsintase (PRPS)	PRPS1		PRPS-superaktiwiteit
	PRPS2	Testis	
	PRPS1L1	Onbekend	
Transaldolase 1 (TALDO1)	TALDO1	Onbekend	TALDO1-defek
6-Fosfofruktokinase (PFK)	PFKL1	Lewer	
	PFKM	Spiere	
	PFKP	Rooibloedselle	

Fruktose-1,6-bifosfatase (FBP)	FBP1	Lewer	Fruktose-1,6-bifosfatase defek
	FBP2	Spiere	
Fruktose-bifosfaaldolase	ALDOA	Spiere en sentruweestelsel	Aldolase defek in rooibloedselle en miopatie en hemolitiese anemie
	ALDOB	Lewer, niere, intestinum	Oorerflik fruktose-intoleransie defek
	ALDOC	Dieselfde as ALDOA en in rooibloedselle	
2-Deoksiribose-5-fosfaaldolase	DERA	Onbekend	

Defekte van die pentosefosfaatweg is van die nuutste bekende defekte. Defekte soos ribosefosfaatisomerase (RPIA) en transaldolase (TALDO1) is eers onlangs beskryf (Wamelink *et al*, 2005:18). Pasiënte met defekte van die pentosefosfaatweg het veral neurologiese- en lewerskade getoon. Dit wil voorkom of bloedkaartjie analyses van die suikerfosfate met behulp van HPLC-MS-MS semi-kwantitatief aangewend kan word om die defekte te identifiseer. Die onstabiliteit van die fosfo-esters en ensieme wat steeds aktiwiteit vertoon nadat die materiaal verkry is, is enkele aspekte wat tans nog probleme verskaf. Poliöl-analises met behulp van GC-MS kan egter as 'n siftingsmetode aangewend word (Kusmierz *et al*, 1989:39).

3.2.3.5 Aminosuikermetabolisme

Aminosuikers is veral van belang vir die biosintese van strukturele koolhidrate. 'n Voorstelling van die metabolisme betrokke by aminosuikermetabolisme sowel as die betrokke ensieme word in Figuur 3.2.3.5.1 en tabel 3.2.3.5.1 gegee.

acetyltransferase (GNPNAT)			
N-Asetielglukosamien-6- fosfaatdeasetilase (AMDHD)	AMDHD2	Onbekend	
Fosfoglukomutase (PGM)	PGM3	Sien tabel 3.2.3.4.1	Sien tabel 3.2.3.4.1
UDP-N-Asetiel- glukosamien pirofosforilase 1	UAP1	Testis, plasenta en spiere	
Glukosamien (UDP-N- asetiel)-2-epimerase/N- asetielmannosamien kinase	GNE	Meestal skelet spiere	Sialsuururia (CMP-NeuAc allosteriese reguleringsdefek
Sfingometelien fosfodi- esterase (suuragtig 3A)	SMPDL3A	Onbekend	
Fosfohistidienfosfatase	PHPT1	Onbekend	
N-Asetielneur- amiensuursintase	NANS	Alle weefsel	
Sitidienmonofosfaat-N- asetielneuramiensuursintase	CMAS	Onbekend	
Di-N-asetielchitobiase	CTBS	Onbekend	
Chitinase	CHIT1	Onbekend	CHIT1-defek sonder kliniese simptome
Suurchitinase	CHIA	Baie hoog in longe	
Heksosaminidase	HEXA	Onbekend	GM2- gangliosidose: Tay-Sacks se

			siekte / Sandhoff se siekte
	HEXB	Onbekend	GM2-gangliosidose: Sandhoff se siekte
Renienbindingsproteïen	RENBP	Onbekend	
N-Asetielglukosamien-sintase	NAGK	Onbekend	
Sitochroom B5R3 reduktase 3	CYB5R	Onbekend	Methemoglobinemie I, II, III

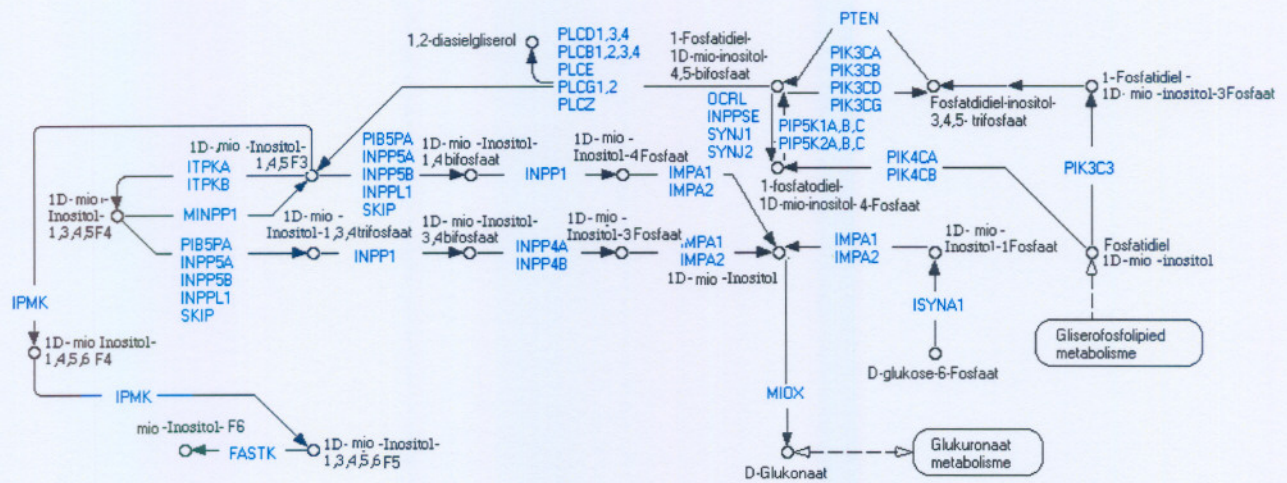
Die aminosuikermetabolisme word gekenmerk aan besonder min iso-ensieme wat betrokke is by die metabolisme. Metabolisme waar iso-ensieme nie voorkom nie, word gewoonlik gekenmerk aan ernstige defekte wat maklik opspoorbaar is (Kanehisa Laboratories, 2005). Hierdie metabolisme is dus uitsonderlik aangesien min defekte van die aminosuikermetabolisme bekend is. Verskeie faktore mag egter 'n rol speel. Defekte van die aminosuikermetabolisme mag so ernstig wees dat babas met die defekte nie lewend gebore word nie. Die teenoorgestelde kan egter ook waar wees; die defekte word nie opgespoor nie, aangesien dit nie ernstige simptome veroorsaak nie.

Aminosuikers kom in die dieet voor en dit mag moontlik aan die vereistes van 'n normale lewe voldoen (Anderson, 2005:189). Laasgenoemde blyk egter onwaarskynlik te wees, aangesien die aminosuikers waarskynlik nie opgeneem sal word nie, of vertering van die strukture sal geskied. Die moontlikheid dat die defekte baie ernstig kan wees, wil op die oog af meer aanvaarbaar lyk. Weinig analitiese tegnieke, wat die defekte sal kan opspoor, bestaan en indien babas vroeg reeds geaborteer word, is daar weinig analyses wat uitgevoer word en dus bly die defekte onopgespoor.

3.2.3.6 Inositolfosfaatmetabolisme

Mio-inisitol, wat deel is van fosfatidielinositol, speel 'n belangrike rol in selmembraanstrukture en die fosfatidielinositolseinsisteem (kalsiumhomeostase). 'n Ander biologiese rol van inositol-fosfate is die regulering van hemoglobien se affiniteit vir suurstof. Die rol van die verbindings as anti-oksidant sowel as antikanker agente word tans ondersoek (Barrientos & Murthy, 1996:40).

Geen direkte ensiemdefekte is in die metaboliese weg geïdentifiseer. Die inositolfosfaat-verbindings is wel betrokke by sommige multifaktoriale defekte. By tipe 2 diabetes pasiënte is urinêre mio-inositol vlakke 6.5 keer hoër as dié van gesonde kontrolepasiënte (Yoshii *et al*, 2001:115). Verhoogde mio-inositol en verlaagde inositol-fosfolipiede is waarneembaar in die brein van pasiënte met Alzheimer se siekte, wat indirek bydra tot dié siektetoestand (Shimohama *et al*, 1998:159). Die metabolisme wat betrokke is by mio-inisitolfosfaat, word in Figuur 3.2.3.6.1 weergegee. Ensieme, iso-ensieme en defekte word in Tabel 3.2.3.6.1 weergegee.



Figuur 3.2.3.6.1: Skematiese voorstelling van die inositolfosfaatmetabolisme (Kanehisa Laboratories, 2005).

Tabel 3.2.3.6.1: Ensieme, isosieme en bekende defekte van inositolfosfaatmetabolisme (McKusick, 2005).

Ensiem	Isosiem	Weefsel	Defekte
Mio-inisitolfosfaatsintase 1A	ISYNA1	Onbekend	
Mio-inisitol-1-monofosfatase	IMPA1	Onbekend	
	IMPA2	Verhoog in brein	
Inositolpolifosfaat-4-fosfatase	INPP4A	Onbekend	Litium behandelbare psigiatrisie afwykings
	INPP4B	Onbekend	
Inositolpolifosfaat-1-	INPP1	Onbekend	

fosfatase			
Fosfatidielinositol-(4,5)-bifosfaat-5-fosfatase	PIB5PA	Brein/ hart/ dunderm/ long	
Inositolpolifosfaat-5-fosfatase	INPP5A	Hart, brein en spiere	
	INPP5B	Onbekend	
Inositolpolifosfaatfosfatase agtig	INPPL1	Hart, spiere en plasenta	
Spier- en nierverrykte inositolfosfatase	SKIP	Spier en niere	
Meervoudige inositolpolifosfaatfosfatase	MINPP1	Alle weefsels – hoog in nie- re, lever en plasenta	Tiroïed karsinoom
Inositol-1,4,5-trifosfaat-3-kinase	ITPKA	Onbekend	
	ITPKB	Onbekend	
Inositolpolifosfaatmultiki-nase	IPMK	Onbekend	
Fas-geactiveerde serien/treonienkinase	FASTK	Onbekend	
Fosfatidielinositol-4-kinase	PIK4CA	Onbekend	
	PIK4CB	Onbekend	
Fosfoinositol-3-kinase	PIK3C3	Onbekend	
	PIK3CA	Onbekend	Bors- en ovariumkanker
	PIK3CB	Onbekend	
	PIK3CD	Onbekend	

	PIK3CG	Hart, spiere, pankreas, lewer	
Mio-inositol-oksigenase	MIOX	Onbekend	Diabetes nefropatie
Fosfatidielinositolfosfatase	OCRL	Onbekend	Lowe se sindroom Dent se siekte
	INPP5E	Onbekend	
	SYNJ1 en 2	Onbekend	
Fosfolipase C delta	PLCD1,3,4	Onbekend	
Fosfolipase C beta	PLCB1,2,3,4	Onbekend	
Fosfolipase C gamma	PLCG1,2	Onbekend	
Fosfolipase C epsilon	PLCE	Onbekend	
Fosfolipase C zeta	PLCZ	Onbekend	
Fosfatase en tensin homo- loog	PTEN	Onbekend	
Fosfoinositol-5-kinase	PIP5K1A,B, C	Onbekend	Korneale distro- fie
	PIP5K2A,B, C	Onbekend	

3.2.4 Metabolisme van Oligosakkariede en Polisakkariede

Oligosakkariede en Polisakkariede is belangrik as gevolg van die strukturele en funksionele rol wat dit in liggaam vervul. Die metabolisme van die komplekse suikers sal bespreek word in dié afdeling van Hoofstuk 3. Die fokus sal hoofsaaklik val op die glikogeenmetabolisme, glikosamienglikaanmetabolisme en die proteo-glikaanmetabolisme. Al die verbindings het funksionele- en strukturele funksies in die liggaam. Van hulle kan as hormone en ensieme optree. Meeste van die defekte is in die degradasie van die

verbindings in die liggaam. Defekte in die betrokke metaboliese weë is klinies baie ernstig en lei tot die dood van die pasiënt.

Ernstige siektetoestande kom in die oliggosakkariedgroep voor. Glikogeenstoringsiektes vind plaas wanneer defekte in die degradasie en sintese van glikogeen voorkom. Daar is 10 verskillende defekte wat in hierdie groep voorkom. Die lewer (en in sommige gevalle spiere) se funksionaliteit word deur die defek aangetas. Die pasiënte toon ook asidose as gevolg van lewerensiemaktiwiteit wat verhoog (Chen & Burchill, 1997:938). Lisosomale defekte is aangebore metaboliese afwykings wat die degradasie ensieme van komplekse koolhidraatgroepe in die lisosome beskryf. Laasgenoemde defekte lei tot die storing en uitskeiding van abnormale lisosomale produkte. Dit resulteer gevolglik in 'n wye reeks ernstige tot matige simptome. Multisistemiese abnormaliteite en 'n vroeë dood word veroorsaak (Neufeld & Muenzer, 2001:3421).

3.2.4.1 Glikogeenanabolisme en -katabolisme

Dit is moontlik vir die menslike liggaam om glukose te stoor om in toekomstige energiebehoefte te voorsien. Die liggaam stoor glukose in die vorm van glikogeen en die prosesse geskied hoofsaaklik in die lewer en skeletspiere. Twee hoofprosesse is in die metabolisme betrokke, naamlik sintese en die afbraak.

Die beheer van glikogeensintese en -afbraak volg nie identiese meganismes in die lewer en die spiere nie. Die regulering van die prosesse van glukose oordrag veskil: GLUT2 vir die lewer en GLUT4 vir spiere sowel as die heksokinase- (spiere) en glikokinase (lewer) aktiwiteit. Die ensieme is verantwoordelik vir die omskakeling van glukose na glukose-6-fosfaat, wat die aanvanklike stappe in die glikogeensinteseproses is. In die lewer is glukosetransport nie insulien-afhanklik nie. Die lewer kan dus glukose aanwend vir energiegebruik sowel as glikogeenstoring. Die prosesse word streng gereguleer deur die fosforilering en aktivering van glikogeensintase ensiem. In die spiere fasiliteer heksokinase die betrokke reaksie. Die transportsisteen en ensiemaktiwiteit is insulien-afhanklik, wat resulteer in glukosetransport mits die bloedglukosevlakke verhoog is. Verder word die

glikogeensintese weereens goed gereguleer deur die fosforilering en aktivering van glikogeensintase. Die regulering verseker doeltreffende beheer van glikogeensintese in die verskeie weefseltipes (Ferrer *et al*, 2003:127).

Die regulering van *glikogeenafbraak* vind noukeurig plaas. Glikogeenfosforilase aktiviteit resulteer in die afbraak van glikogeen na glukose-1-fosfaat. Die glikogeenfosforilase isoensiem van die lewer word streng met behulp van 'n fosforilase meganisme gereguleer en sodoende nie geaktiveer deur AMP nie. In die betrokke isoensiem in die spiere word meer allosteries gereguleer toegepas. Dit resulteer in die glikogeenafbraak as AMP vlakke verhoog (Ferrer *et al*, 2003:128).

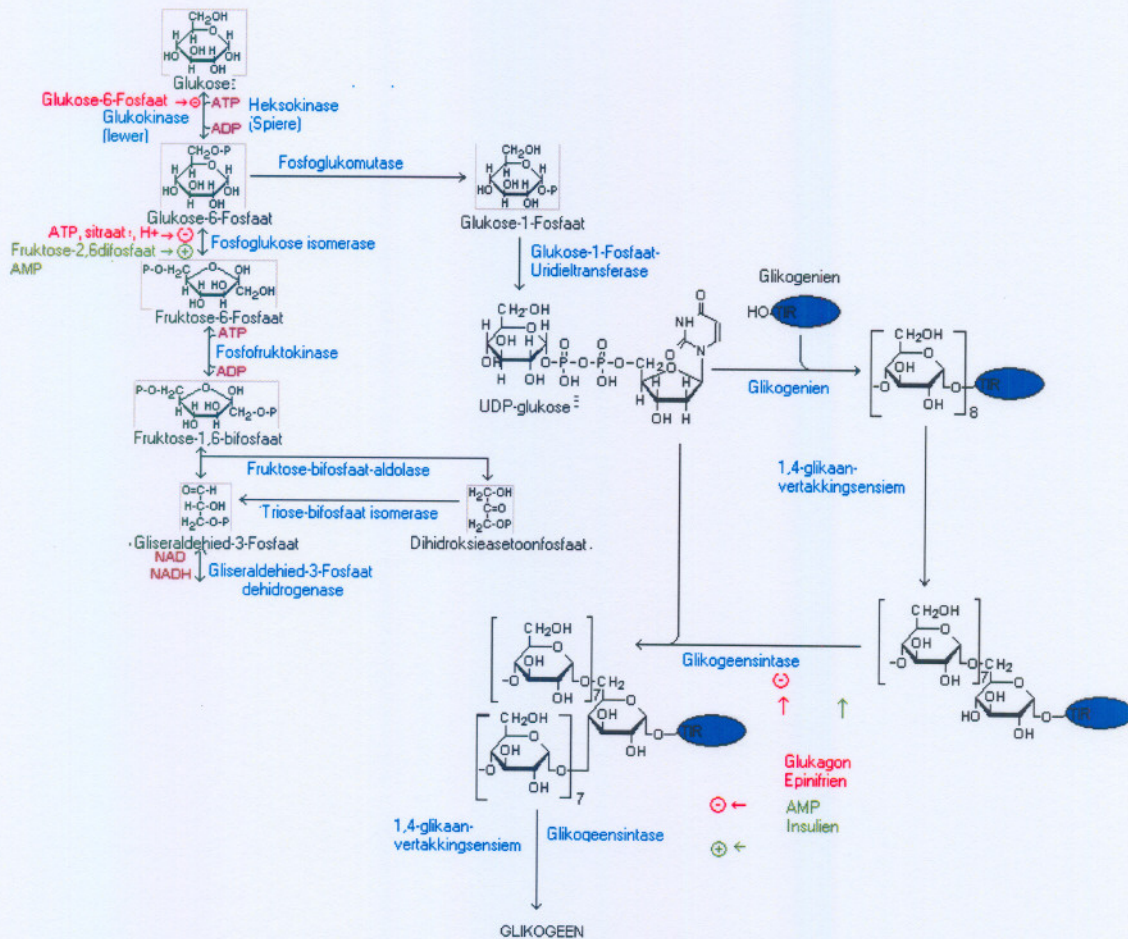
Bostaande prosesse word ook op korttermyn deur hormone gereguleer. Allosteriese regulasie en kovalente modifikasie van die ensieme geskied deur insulien, glukagon en adrenalien. Die ensieme wat betrokke is in die glikogeenmetabolisme, word op die langtermyn gereguleer deur geenekspressie en is afhanklik van die ontwikkelende stadium van die liggaam (Chen & Burchill, 1995:938). Figure 3.2.4.1 en 3.2.4.2 is 'n skematiese voorstelling van glikogeenbiosintese sowel as die glikogeenafbraakprosesse in die lewer en die spiere.

'n Groep aangebore metaboliese defekte in die glikogeenmetabolisme bestaan. Tabel 3.2.4.1.1 gee opsommend die verskillende tussen toepaslike siektes en hul ooreenstemmende ensiemdefekte.

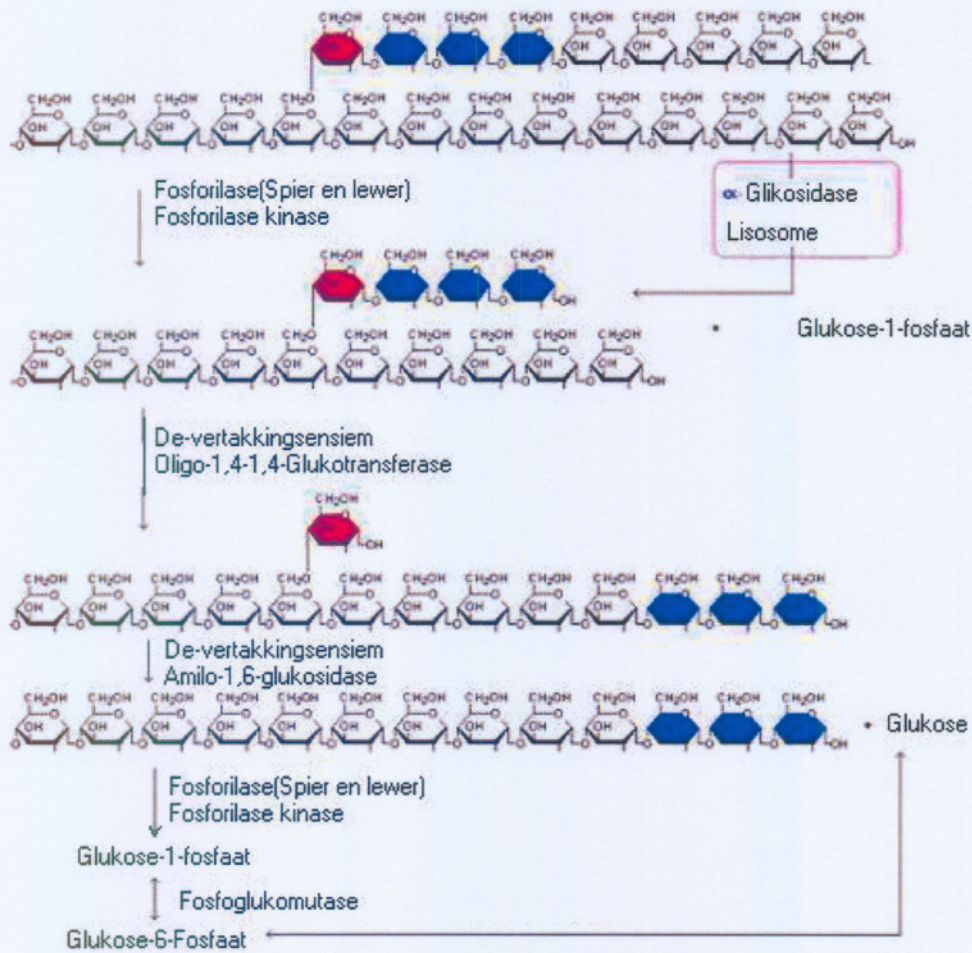
Tabel 3.2.4.1.1: Verskeie glikogeenstoringsiektes en hul ensiemdefekte (Chen & Burchill, 1995:938).

Oorerflike abnormaliteite in die glikogeenmetabolisme	
Spierdisfunksie (minder lewensgevaarlik)	Lewerabnormaliteite (lewensgevaarlik)
Tipe 2 – Glikosidase defek (Pompe se siekte)	Tipe 1 – Glukose-6-fosfatase defek (Von Grieke se siekte)
Tipe 5 - Spier fosforilase defek (McArdle se siekte)	Tipe 2 – Glikosidase defek (Pompe se siekte)
Tipe 7 - Spier fosfofruktokinase defek (Tauri se siekte)	Tipe 3 – Vertakkingsensiem defek (Cori se siekte)

	Tipe 4 – De-vertakkingsensiem defek (Anderson se siekte)
	Tipe 6 - Hepatiese fosforilase defek (Hers se siekte)
	Tipe 9 - Defektiewe lewer fosforilase kinase
	Glikogeensintase defek



Figuur 3.2.4.1.1: Skematiese voorstelling van die biosintese van glikogeen (Chen & Burchill, 1997:937).

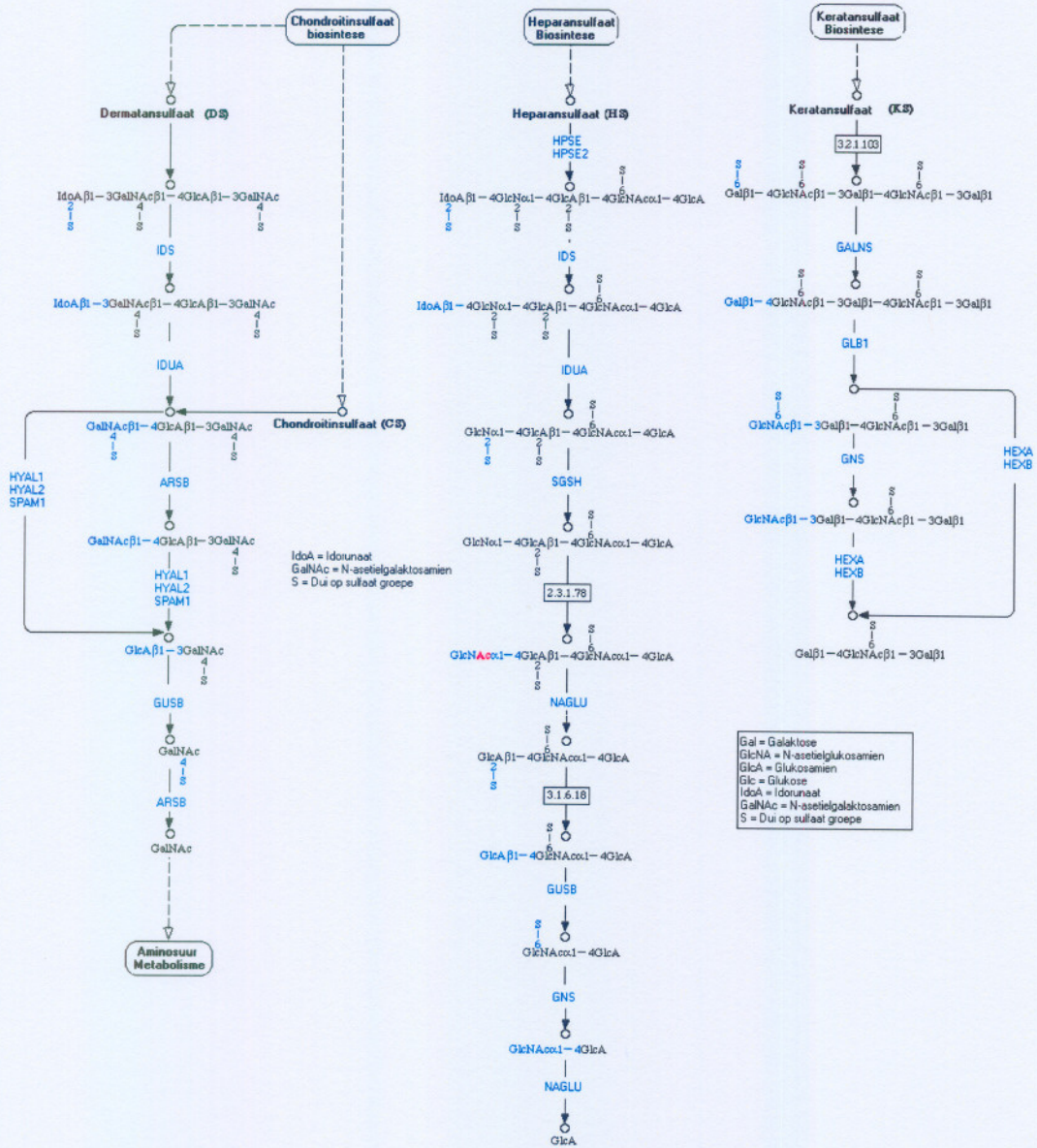


Figuur 3.2.4.1.2 : Skematiese voorstelling van die katabolisme van glikogeen in die lever en die spiere (Chen & Burchill, 1997:937).

3.2.4.2 Glikosamienglikane (mukopolisakkariede) metabolisme

Vir die doel van die studie sal net gefokus word op die katabolisme (afbraak) van glikosamienglikane omrede ernstige defekte in dié metaboliese weë voorkom. Die biosintese defekte van glikosaminoglikane is min en sluit die CDG defekte in, wat met behulp van isoelektriese fokusering gemonitor kan word. Figuur 3.2.4.1 en tabel 3.2.4.2.1

stel die 'n skematiese voorstelling van die degradasie van glikosaminoglikane sowel as die betrokke ensieme voor.



Figuur 3.2.4.2.1: Skematiese voorstelling van die glikosamienglikaanafbraak (Kanehisa Laboratories, 2005).

Tabel 3.2.4.2.1: Ensieme, isosiem en bekende defekte van die glikosamienglikaan metabolisme (McKusick, 2005).

Ensiem	Isosiem	Weefsel	Defek
Iduronaat-2-sulfatase	IDS		MPSII – Milde en ernstige Hunter sindroom
α -L-iduronidase	IDAU		MPS I – Hurler sindroom, Hurler-Sheie sindroom.
Hialuronoglukosaminidase	HYAL1	Oral behalwe brein	MPS IX
	HYAL2		
	SPAM1	Testis	
Arielsulfatase B	ARSB		MPS IV – Ernstige en milde Maroteaux-Lamy
α -N-asetielglukosaminidase	NAGLU	Kom verhoog voor in lewer, ovarium en leukosiete	ALDOA-defek met hemolitiese anemie
Glukosamien (N-asetiel)-6-sulfatase	GNS		MPS IIID- Sanfillipo IIID
N-sulfoglukosamien sulfhidrolase	SGSH	Oral behalwe brein	MPS IIIA- Sanfillipo IIIA
Heparanase	HPSE	Verhoog in plasenta en nie in hart, brein, lewer, spier, long, niere en pankreas nie.	Geassosieer met borskanker
	HPSE2		
Galaktosamien (N-asetiel-6-sulfaat) sulfatase	GALNS		MPS IVA – Morquio sindroom A
β -1-galaktosidase	GLB1		G _{M1} -gangliosidase MPS IVB – Morquio sindroom B
Heksosaminidase	HEXA		G _{M2} -gangliosidase: Tay Sachs se siekte en Sandhoff se siekte
	HEXB		G _{M2} -gangliosidase: Sandhoff se siekte Spinale spieratrofie

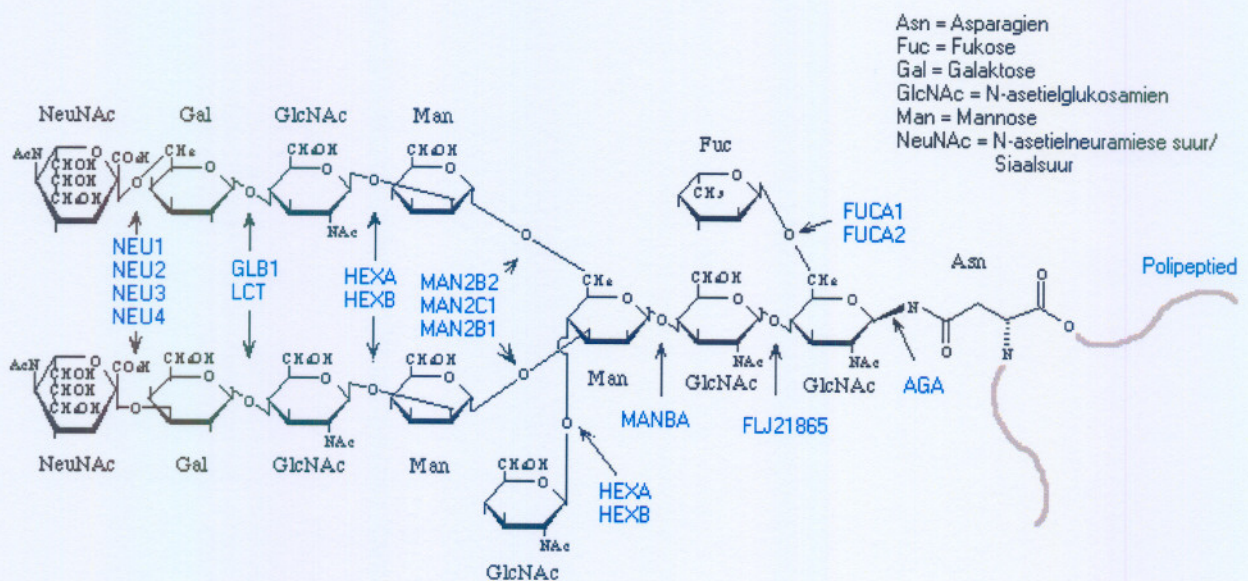
In hierdie groep is 'n reeks lisosomale storingsdefekte, naamlik mukopolisakkaridose waar ensieme, wat verantwoordelik is vir die degradasie van glikosaminoglikane (GAG's), defektief is. Tabel 3.2.4.1 toon die betrokke ensieme en isoensieme sowel as siektetoestande aan wat in die weg voorkom. Daar is 11 bekende ensiemdefekte en sewe groepe MPS-defekte. Die akkumulering van die GAG's in die liggaam resulteer in multisistemiese disfunksie. Die kliniese simptome is kronies en progressief. Behandeling van die siektes is beperk. Beenmurgoorplanting, ensiemvervangingsterapie en geen terapie word voorgestel om die lewenskwaliteit van die pasiënte te verbeter (Neufeld & Muenzer, 2001:3421).

3.2.5 Proteoglikaanmetabolisme

Die kovalente binding van komplekse oligosakkariedstrukture aan ander biomolekules (in hierdie geval proteïene), speel 'n uiters belangrike rol in die liggaam van die mens. Die verbindings word proteoglikane genoem. Die strukturele variteit van die molekules word gebruik om die stoor van biologiese informasie uit te voer sowel as belangrike seintransduksieprosesse te bewerkstellig. Koolhidrate in glikoproteïene en glikolipiede is op die seloppervlakte teenwoordig soos molekulêre antennas. Verskeie molekules soos ensieme, hormone, antibiotikums en selfs skadelike mikrobies kan aan die koolhidrate koppel en sodoende 'n kaskade van reaksies tot gevolg hê (Lindhorts, 2000:151).

Proteoglikane speel verder 'n rol in baie ander sellulêre funksies. Die serologiese eienskappe, naamlik bloedgroepe, word deur glikoproteïene op die seloppervlakte van rooibloedselle, bepaal (Lindhorts, 2000:176). Kraakbeen bestaan grootliks uit 'n netwerk van kollageenfibrille met proteoglikane tussenin. Die chondroïëtiensulfaat en kernproteïenkomponente in die glikoproteïene het 'n kenmerkende interaksie met die kollageen in die kraakbeen. Proteoglikane moduleer die effek van proteïene groeifaktore. Die faktore moet bind aan die hepariensulfaatkettings van die proteoglikaan om sodoende op teikenselreseptor te koppel om die korrekte invloed op die sel te hê. Hierdie is slegs 'n paar van die funksies wat proteoglikane in die liggaam verrig (Voet en Voet, 1995:267-268).

Soos reeds in Hoofstuk 2 aangedui is, is daar twee proteoglikaangroepe, naamlik die N-gekoppelde- en die O-gekoppelde-oligosakkariede, van belang in die menslike liggaam. Vir die doel van die studie sal net op die katabolisme van die N-glikane gefokus word. Die O-gekoppeld oligosakkariede het minder komplekse oligosakkariedkettings en min siektes word met defektiewe O-gekoppelde oligosakkariede geassosieer. N-gekoppelde oligosakkariede het komplekse oligosakkariedskettings en verskeie siektetoestande kom voor tydens die degradasie van dié glikoproteïene (Voet & Voet, 1995:266). Die biosinteseprosesse van die twee groepe sal ook nie in die studie weergegee word nie. Defekte van die biosintese proses (naamlik CDG-defekte) is reeds in vorige afdelings bespreek. Figuur 3.2.5.1 is 'n skematiese voorstelling van die degradasie van N-gekoppelde-oligosakkariede. Die onderstaande tabel 3.2.5.1 gee 'n uiteensetting van die betrokke ensieme, plek van voorkoms sowel as die siektes wat geassosieer word met die defekte.



Figuur 3.2.5.1: Die skematiese voorstelling van N-gekoppelde oligosakkaried degradasie (Kanehisa Laboratories, 2005).

Tabel 3.2.5.1: Ensieme, isosieme en bekende defekte van die N-gekoppelde oligosakkaried degradasie (McKusick, 2005).

Ensiem	Isosiem	Weefsel	Defek
Sialidase	NEU1(Lisosomale		Sialidose tipe I en II
	NEU2(Sitosolies)	Slegs in spiere, nie fetale lewer nie	Geassosieer met embrioniese karsinoom
	NEU3	Meestal in spiere en testis – minder in pankreas, lewer, hart, brein, tumusklier, prostaat	
	NEU4	Verhoog in lewer en minder in kolon, intestinum, niere, brein en SSS	
β -Galaktosidase	GLB1		G_{M1} -gangliosidase en Morquio sindroom tipe B
Laktase	LCT		Kongenitale laktase tekort
Heksosaminidase	HEXA		G_{M2} -gangliosidase: Tay Sachs se siekte en Sandhoff se siekte
	HEXB		G_{M2} -gangliosidase: Sandhoff se siekte Spinale spieratrofie
α -mannosidase	MAN2B1 (Lisosomaal)		α -mannosidose tipe I en II
	MAN2B2		
	MAN2C1 (Sitosolies)		
β -mannosidase	MANBA (Lisosomaal)		β -mannosidose
Endo- β -N-asetielglukosaminidase	FLJ21865		
α -L-Fukosidase	FUCA1		Fukosidose
	FUCA2 (Plasma)		
Aspartielglukosaminidase	AGA		Aspartielglukosamienurie

Hoofstuk 4

Eksperimentele Metodes

4.1 Inleiding

Uit die vorige drie hoofstukke kan afgelei word dat genetiese defekte van die koolhidraatmetabolisme wel voorkom en waarskynlik meer algemeen is as wat vermoed word. Koolhidraatanalises is moeilik om uit te voer en dit het daartoe bygedra dat die metabolietprofiel van moontlike defekte nog nie goed opgeklaar kon word nie. Daar sal in dié projek dus gepoog word om, leemtes in die analitiese metodes, sowel as die identifikasie van koolhidrate, aan te spreek. Die ontwikkeling van 'n doeltreffende siftingsprosedure met behulp van dunlaagchromatografie, tandem-massaspektrometrie en spektrofotometrie is gebruik in die studie. Die invloed van medikasie op die analisering van mono- en disakkariedes, met behulp van dunlaagchromatografie, sal ook in die eksperimentele metode ondersoek word.

Koolhidraatdefekte maak 'n beduidende persentasie uit van die aantal metaboliese defekte wat jaarliks gediagnoseer word in klinies verwysde gevalle in Suid-Afrika. Hiervan is galaktosemie seker die mees algemene koolhidraatdefek wat suksesvol gediagnoseer kan word (Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte, Noord-Wes Universiteit, Potchefstroom, 2004). DNA-tegnologie sowel as dunlaagchromatografie word tans aangewend om dié siekte te diagnoseer. Ander koolhidraatdefekte soos fruktosemie en lisosomale storingsdefekte is egter moeilik diagnoseerbaar. Moontlikhede om glikogeenstoringsdefekte te identifiseer, is tans uiters beperk. Verder verteenwoordig hiperdeurlaatbaarheid en intoleransie van koolhidraatverbindinge, 'n hele reeks defekte wat nie suksesvol opgespoor kan word nie. Die defekte veroorsaak dat komplekse koolhidrate in die bloed en die uriene voorkom, en resulteer in 'n abnormale kliniese beeld.

Beperkings op bestaande metodes is dat dunlaagchromatografie dikwels nie lei tot 'n finale diagnose nie, terwyl ensiemanalises baie duur is. Voorgestelde metodes, soos die spektrofotometriese monitering van intakte koolhidrate by 195 nm, ionuit-

ruilingschromatografie met amperometriese deteksie, HPLC-skeiding met refraksie-indeksdeteksie en GC-MS metodes, is onsensitief en nie geskik vir die identifikasie van lae konsentrasies suikers in die uriene nie. Derivatisering van koolhidrate met PMP laat egter toe dat lae konsentrasies koolhidrate met behulp van HPLC, LC-MS-MS, CE en PAGE geanaliseer kan word. Die derivatiseringsproses maak die betrokke molekules meer apolêr. Die molekules is dus meer geskik vir omgekeerde fase HPLC en skeiding van struktureel- verwante koolhidrate geskied meer doeltreffend. PMP-derivate van die koolhidrate het die verdere voordeel dat dit ionisasie van die betrokke molekules moontlik maak met behulp van tandem-massaspektrometrie (Lamari *et al.*, 2003:16).

4.2 Die kwalitatiewe identifikasie van koolhidrate met behulp van dunlaagchromatografie

Eenvoudige suikers soos laktose, galaktose, fruktose en glukose (en in sekere gevalle sukrose) word geassosieer met twee tipes moontlike defekte in die metabolisme. Een is 'n direkte kataboliese defek van koolhidrate. In hierdie geval is van die ensieme in die liggaam, wat verantwoordelik is vir die metabolisering van suikers, onderaktief of glad nie aktief nie. Die tweede moontlike tipe defek (wat veral ook van belang is in hierdie projek) is dat moontlike wanabsorpsieprobleme in die liggaam manifesteer en gevolglik word koolhidrate en hul verwante metaboliete in die uriene uitgeskei. Dit is moontlik om met behulp van dunlaagchromatografie tussen hierdie twee hoofipes defekte te onderskei. Die metode bly egter kwalitatief (Sewell, 1991:224). Die apparaat en benodighede vir die betrokke prosedure word in table 4.2.1 gegee.

4.2.1 Apparaat en reagentie:

Tabel 4.2.1.1: Apparaat en reagentie benodig vir dunlaagchromatografie

Aparaat en Reagentie	Verskaffer
1. TLC- plate (5553-silika-gel)	Merck
2. Glastenk met deksel	Supelco
3. Hamilton spuitnaalde	Seperations
4. Oond (100°C)	Labotec S.A
5. Oligo-standaarde: geselekteerde konsentrasies van laktose, xilose, glukose, galaktose ens.	Sigma/Fluka
6. Mobile fase : 50 ml butanol, 25 ml Asynsuur, 25 ml H ₂ O (berei vars voor)	Sigma/Fluka
7. Kleurmiddel: H ₂ SO ₄ orsinol (berei vars voor)– 40 mg orsinol	Sigma/Fluka
- 80ml Asetoon	Fluka
- 4 ml H ₂ SO ₄	Fluka

4.2.2 Prosedure

Die dunlaagchromatografieplate word voorberei vir ontwikkeling in blokke van 10x10cm. Die plate word 1 by 1.5 cm van elke kant af gemerk en monsteraanwending geskied 0.5 cm opeenvolgend. Hierdie indeling maak voorsiening vir ongeveer 5 aanwendingsbane per plaat. Die plate is dan gereed vir die plasings van die urienmonsters. Die volume wat aangewend word is afhanklik van die pasiënt se ouderdom en kreatinienwaarde. Dit varieer dus van monster tot monster (Sien tabel 4.2.2.1). Die ouderdoms-afhanklike faktor is afgelei deur Blom *et al.* (1983: 222)

Tabel 4.2.2.1: Inligting vir die bepaling van die analitiese volume.

Ouderdom (in jaar)	F	2F
0-1	0.075	0.150
1-2	0.1	0.200
2-8	0.150	0.300
>8	0.200	0.400

Die toepaslike hoeveelheid uriene* word op die plaat geplaas deur middel van 'n lae-volume Hamilton spuit. Die hoeveelheid word soos volg bereken:

$\frac{2F}{C}$

$\times 100 = \mu\text{l}$

$2F =$ leeftydsafhanklike faktor $\times 2$

$C =$ [Kreatinien] in mmol/l

*- 'n Identifikasiestandaard wat 'n aantal bekende koolhidrate bevat, word saam met die urienmonsters aangewend op die dunlaagplaat op die sentrale baan.

Ontwikkeling van die plate geskied deur die plaat in 'n spesiale ontwikkelingshouer te plaas tot by die diepte van die mobiele fase, wat vooraf op die plaat afgemerk is. Die plate word twee maal ontwikkel teen 2 – 2.5 ure per chromatografiese skeiding. Tussen opeenvolgende ontwikkelings word die plate vir 60 minute gedroog. Dieselfde drogingsproses is ook van toepassing voor die kleuringsproses. Kleuring geskied deur die dunlaagchromatografieplaat in H_2SO_4 -orsinol oplossing te plaas en vir 8-10 minute in 'n oond by $100\text{-}105^\circ\text{C}$ te droog. Die suikers word dan met behulp van die standaard sowel as die R_f -waarde geïdentifiseer (Sewell, 1991:224-225). Die R_f -waarde word bepaal deur die volgende formule:

$$R_f\text{-waarde} = \frac{\text{Afstand van analiet op TLC-plaat}}{\text{Afstand van loopmiddel op die TLC-plaat}}$$

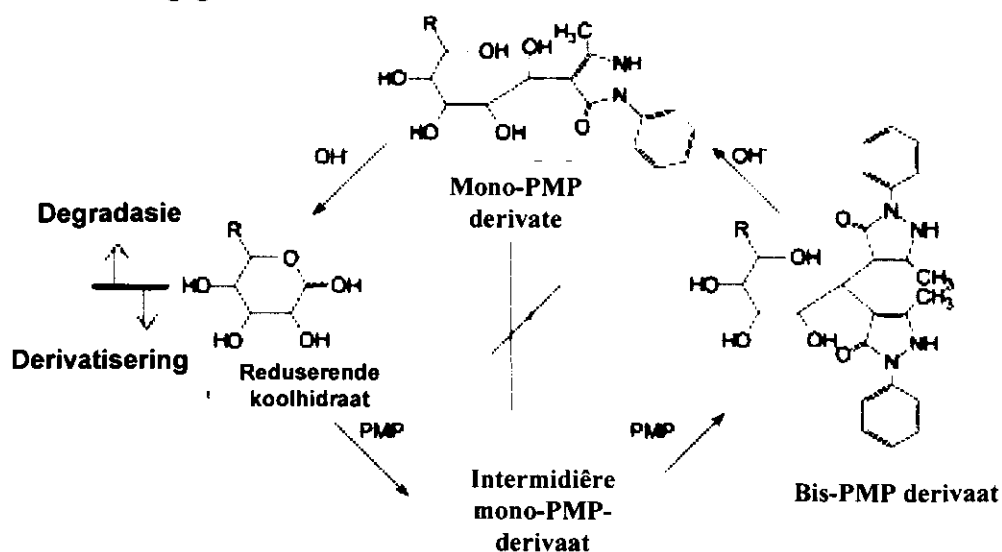
4.2.3 Standaardisasie en toepassings van dunlaagchromatografie

Standaardisasie van die dunlaagskeidingsproses is belangrik om beperkings van die tegniek te identifiseer. Individuele koolhidrate is met behulp van dunlaagchromatografie bestudeer deur chromatografiese skeidings ses keer te herhaal. Hieruit is die gemiddelde Rf-waarde bepaal. Die deteksielimiëte is bepaal deur verskillende konsentrasies van die koolhidraatmengsels, wat bestaan uit laktose, sukrose, galaktose, glukose en xilose te ondersoek. Konsentrasies van 0,5mM, 1mM, 3mM, 6mM, 9mM en 12mM is hiervoor gebruik (sien Hoofstuk 5: Figuur 5.2.1.1).

Die gestandaardiseerde metode is gebruik om dunlaagchromatografie op verskillende groepe pasiënte se uriene uit te voer. Pasiënte wat lei aan parkinsonisme, ADHD pasiënte en pasiënte met aangebore metaboliese siektes is bestudeer. Laasgenoemde is 'n groot groep wat bestaan uit pasiënte met galaktosemie, fruktosurie, laktose intoleransie, diabetes, pentosurie, glikogeenstoringsiektes en lisosomale storingsiektes. Rf-waardes is bereken vir die identifikasie van die betrokke koolhidrate waarvan die kommersiële standaard beskikbaar is. Die verskille ten opsigte van die koolhidraat-“patroon” op die profiel, is ook gebruik om komplekse koolhidraatdefekte soos glikogeenstoringsiektes en lisosomale defekte te identifiseer. Die invloed van medikasie, soos Parasetamol en Valproaat op die dunlaagprofile, is ook ondersoek.

4.3 Derivatisering van koolhidrate met 1-feniel-3-metiel-2,5-pirozaloen (PMP) en die analisering daarvan met behulp van elektrospoei-ionisasie en tandem massaspektrometrie

Ongederivatiseerde koolhidrate kan nie deur MS-deteksie soos FAB of ESI geskied nie, as gevolg van polariteit, termiese labiliteit en relatief nie-vlugtige eienskappe (Lamari, 2003:16). Derivatisering lewer 'n voordeel van minder gekompliseerde spektra en verhoogde respons. In die prosedure van koolhidraatdeteksie, is derivatisering met behulp van PMP (1-Feniel-3-metiel-2,5-pirazoloen) uitgevoer. Dit is aangetoon dat die PMP-derivate se sensitiwiteit ten opsigte van deteksie 'n faktor van 100 beter is as ongederivatiseerde suikers (Rozaklis, 2002:138). Die grootste nadeel van hierdie metode is dat ketose-bevattende suikers (aan die reduserende kant van die molekule) soos fruktose, sukrose en raffinose nie gederivatiseer word nie. Die furanose-ring is die gunstige vorm van 'n ketosuiiker. Die ketose-vorm is ongunstig vir die betrokke reaksie en geen meetbare produk word geproduseer nie. 'n Ander analitiese metode, wat later beskryf sal word, is spesifiek in die monitering van urinêre fruktose gebruik. Die derivatiseringsproses van aldose suikers kan soos volg voorgestel word en apparaat en reagense van prosedure word in tabel 4.3.1.1 gegee.



Figuur 4.3.1: Die derivatisering van aldose suikers met behulp van PMP (Honda *et al.*, 2003:1693).

4.3.1 Apparaat en reagentie

Tabel 4.3.1.1: Apparaat en reagentie benodig vir die PMP-koolhidraatderivaat analisering

Reagents en apparaat	Verskaffers
Ammoniak	BDH: Merck
Mieresuur	BDH: Merck
Monosakkariedes: galaktose, glukose, rhamnose, xilose en ribose, mannose	Sigma-Aldrich
Disakkariedes: laktose, maltose	Sigma-Aldrich
Maltodekstrien	Sigma-Aldrich
1-Feniel-3-metiel-2,5-pirazolone (PMP)	Fluka
Chloroform	BDH: Merck
Stikstofdroër	Affrox
Eppendorfbuise (1.5ml)	Merck
LC-ESI-MS-MS en ESI-MS-MS	VG Quatro II triple quadrupole mass spectrometer
Masslynx-data-analiseringsprogram	Masslynx TM Micromass

4.3.2 Prosedure en standaardisasie van die derivatiseringsmetode en analisering van koolhidrate met behulp van elektrospoei-tandem-massaspektrometrie

Vir die doel van die standaardisasie is twee verskillende mengsels van koolhidrate opgemaak. Mengsel 1 het mono- en disakkariedes (1mmol) bevat, terwyl mengsel 2 maltodekstriene (oligosakkariedes) (1mmol) bevat het. Die mengsels is gedroog onder stikstof en opgelos in 100µl van die derivatiseringsreagents (250mmol/l PMP, 400mmol/l NH₃, pH = 9.1). Variasies in laasgenoemde konsentrasies is gebruik om optimale kondisies te verkry. Die mengsel is by 70°C vir 120 minute verhit. Die mengsel is vervolgens aangesuur om die pH neutraal te maak. Dit is gedoen deur die byvoeging van 100µl mieresuur met 'n konsentrasie van 800mmol/l. 300 µl Water is bygevoeg om 'n totale volume van 500 µl op te maak. 'n Ekstraksie met chloroform (500µl) is vervolgens uitgevoer om die oormaat PMP te verwyder. Die waterige fase is aan 'n C18 soliede fase ekstraksie onderwerp (Rozaklis *et al.*, 2002:134)

Die soliede fase ekstraksiekolomme is voorberei met twee opeenvolgende wasstappe. 'n Mengsel van 500ml asetoniëtriel, 500ml water en 250µl mieresuur (2 x 1ml van die mengsel) is tydens die wasstappe gebruik. Die mobiliteit van die mengsel deur die kolomme is verhoog na 1ml/min deur van vakuum gebruik te maak (met behulp van 'n "vacume manifold"). Die druk het gevarieer ten opsigte van die vloeitempo van eluëermiddel. Vervolgens is die analitiese mengsel op die soliede fase kolomme geplaas en met 1x 500µl en 2 x 1000µl water gewas. Die kolomme is vir 15 min onder lae druk gedroog. Die oortollige PMP is uit die kolomme gewas met behulp van chloroform (2 x 1000µl). Die kolomme is verder gedroog vir 15 minute. Die PMP derivat is met behulp van 'n asetoniëtriel/water oplossing (500ml asetoniëtriel, 500ml water en 250µl mieresuur) 4 x 250µl uitgewas (Rozaklis *et al.*, 2002:134). Die mengsel is nou gereed om gespuit te word. 25 µl van die gederivatiseerde mengsel is vervolgens met behulp van elektrospoei massaspektrometrie geanaliseer.

Die standaardisasie het geskied deur van verskeie prosedures gebruik te maak, naamlik:

- Ekstraksie met en sonder die soliede fase ekstraksiestap (MS-MS-skandering)
- Presisie: inter-inspuitingspresisie en inter-groeppresisie (MS-MS-skandering)
- LC-MS-MS analisering van konsentrasiereekse van 'n koolhidraatmengsel om die sensitiwiteit, liniêre regressie en detekselimiete van die analise te bepaal.

4.3.3 Elektrospoei-tandem-massaspektrometrie spesifikasies vir die analisering van koolhidraatderivate

Twee konfigurasies is gebruik vir die analisering van die PMP-derivate. Een daarvan is om die gederivatiseerde mengsel direk in die elektrospoeibron in te spuit en die koolhidraat-derivate met behulp van sogenaamde voorganger ioonanalises op te spoor. In hierdie konfigurasie word al die moederione (pseudo-molekulêre ione), wat 'n

karakteristieke m/z 175 ion produseer, in die botsingsel opgespoor. Die massaspektrometer is 'n VG Quatro II tandem massaspektrometer met elektrospoei ionisasie. Die eerste massa analiseerder het geskandeer oor 'n massagebied van m/z 450 – 1500. Argon is gebruik as botsingsgas teen 'n druk van 1.3×10^3 mBar. Die tweede massa analiseerder is staties aangewend by m/z 175. Stikstof is as nebuliseringsgas teen 250 l/uur gebruik, terwyl die kapillêre sproei op 50 l/uur stikstof gestel is. Die potensiaalverskil oor die kapillêr was 3.5 kV. Die konieselens-spanning was 35 volt terwyl die botsingsenergie op 60 volt gestel was. Beide massa analiseerders is aangewend teen 'n resolusie van 13.5. In hierdie konfigurasie word van 'n HP 1090 hoëdruk vloeistofchromatograaf gebruik gemaak as 'n konstante infusiepomp vir die mobiele fase teen $10 \mu\text{l}/\text{min}$.

Dit is egter ook moontlik om mono- en disakkarieses te skei met behulp van kolomchromatografie en in hierdie konfigurasie word die massaspektrometer met soortgelyke stellings met direkte infusie as 'n detektor na die chromatografiese skeiding aangewend. Vir chromatografiese skeiding is die HP 1090 hoëdruk vloeistofchromatograaf toegerus met 'n 25 cm LUNATM C18 kolom. Die mobiele fase het bestaan uit twee loopmiddels, A en B. Loopmiddel A het bestaan uit 10% asetonitriël met 0.1M ammoniumasetaat en loopmiddel B het bestaan uit 40% asetonitriël en 0.1M ammoniumasetaat. Chromatografiese skeiding van die koolhidrate is verkry deur van 'n gradiëntanalise gebruik te maak. Die gradiënt het bestaan uit 10% van loopmiddel B wat oor 'n tydperk van 40 minute verander het na 80% van B. Die vloeï deur die kolom was $0.2 \text{ ml}/\text{min}$ (Shen & Perrealt, 1998:50). Die HP 1090 outomatiese inspuiter is gebruik om $25 \mu\text{l}$ monster per keer te analiseer. Die mobiele fases is ontgas met behulp van helium.

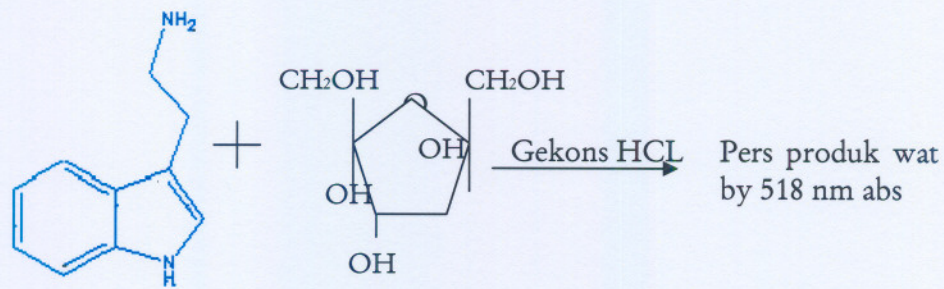
4.3.4 Toepaslike uriene-analisering van verskeie groepe, naamlik 'n kontrolegroep en pasiënte met aangebore metaboliese siektes

Urienmonsters ($100 \mu\text{mol}$ van die kreatinien ekwivalent) is gedroog en hergesuspendeer in $100 \mu\text{l}$ van die derivatiseringsreagens. ($250 \text{ mmol}/\text{l}$ PMP, $400 \text{ mmol}/\text{l}$ NH_3 , $\text{pH} = 9.1$). Die

mengsel is goed gevorteks en verhit by 70°C vir 90 minute. Die mengsel is aangesuur met 2 maal die molêre oormaat van mieresuur (100 µl van 'n 800mmol/l) en opgemaak tot 500 µl met water. Elke monster is een keer geëkstraheer met 500µl chloroform om van die oormaat PMP ontslae te raak en vir 5 minute teen 13 500g gesentrifugeer. Die supernatant is vervolgens aangewend om 'n C18 soliede fase ekstraksie uit te voer volgens die gestandaardiseerde metode (paragraaf 4.3.2). Tandem-MS-MS analisering van die PMP-derivate het geskied volgens kondisies wat gebruik is in paragraaf 4.3.3. Die interpretasie van die koolhidraatspektrum is gedoen deur gebruik te maak van relevante verhoudings van metaboliete. Biochemiese belangrike koolhidrate is in verhouding tot mekaar en tot die interne standaard voorgestel. Die verhoudings is vergelyk met dié van kontrolepatiënte s'n om 'n moontlike defek te identifiseer. Abnormale mono- en disakkariedverhoudings het gelei tot 'n addisionele chromatografiese analise van PMP-derivate met behulp van die LC-MS-MS (kondisies volgens paragraaf 4.3.3).

4.4 Spektrofotometriese analisering van fruktose en fruktose-bevattende koolhidrate (triptamien-toets)

Soos reeds aangetoon, bly die ketosuikers 'n probleem wat analisering betref. Dit is chemies moeilik om die ketose-ring te breek en derivate te produseer, tensy die suiker blootgestel word aan ekstreme kondisies. Die ringstruktuur bly dan “oop” en die derivaat kan gevolglik vorm. Die derivaat sal ongelukkig glad nie deur sensitiewe apparaat geanaliseer kan word, as gevolg van die hoë of lae pH nie. 'n Spektrofotometriese metode is dus ontwikkel om die derivaat kolometries te bepaal. triptamien-HCl word as derivatiseringsmiddel gebruik. Die reaksie word in Figuur 4.4.1 voorgestel.



Figuur 4.4.1: Ketosuiikers wat met triptamienreagens reageer (Taylor, 1995:215).

4.4.1 Apparaat en Reagense

Tabel 4.4.1.1: Apparaat en reagense benodig vir triptamien-fruktosebepaling:

Reagense en apparaat	Verskaffers
1) Gekonsentreerde HCl	BDH: Merck
2) Triptamienreagens: 0.1M Triptamien-HCl opgelos in dubbel gedistilleerde water.	Fluka
3) 16 x 150mm borosilikaat buise	Merck
4) 60°C waterbad	Labotec
5) Spektrofotometer 518nm	Merck

4.4.2 Prosedure en standaardisasie

Die metode wat gevolg is vir die standaardisasie van die spektrofotometriese analise is soos volg: 'n Standaardreeks fruktose-oplossings (wat bestaan uit konsentrasies van 0.5mM; 1mM, 2mM; 3mM; 4mM; 5mM) en 'n blanko-oplossing is opgemaak. Urienmonsters van 'n kontrolegroep, moontlike fruktosurie pasiënte, en pasiënte met ander suikers in hul uriene, is verder in die studie gebruik om die toepaslikheid van die metode te toets en te optimaliseer. 'n 100µl Van die blanko, standaard en urienmonster en 100µl triptamienreagens is in borosilikaatbuisie bymekaar gevoeg. Hierby is 3 ml gekonsentreerde HCl gevoeg. Die buise is vervolgens in 'n waterbad van 60°C vir 15 minute geplaas. Die buise is vir 40 minute afgekoel. Die absorpsie is by 518 nm gemeet (Taylor, 1995:p217).

'n Standaardkromme van die fruktose-konsentrasiereeks is opgestel om die konsentrasie van fruktose in die uriene te bepaal. 'n Kontrolegroep (waarvan alle dunlaagchromatografie resultate normaal was) is geselekteer om moontlike fruktosevlakke in normale metaboliese profiele te bepaal. Die normaalverspreiding van die kontrolegroep is met die normaalverspreiding van 'n groep, wat verhoogde fruktosevlakke toon, vergelyk. Verder is die invloed van medikasie, soos Parasetamol en Valproaat, op die analise bepaal. Die metode kan volgens die literatuur gebruik word in die bepaling van fruktose, fruktosans en inulien. Ander suikers soos monosakkariede, disakkaried en suikerfosfate is ook gemonitor.

Hoofstuk 5

Resultate en Bespreking

5.1 Inleiding

Hierdie studie wat handel oor die ontwikkeling van meer sensitiewe deteksietegnieke vir die analises van koolhidrate is om verskeie redes van belang. Eerstens is koolhidrate (veral glukose) van besondere belang vir energieproduksie maar ook vir die vorming van strukturele molekules. Tweedens wil dit voorkom of koolhidraatdefekte, veral in Suid-Afrika, 'n groot rol mag speel in die algemene gesondheid van die populasie (Henderson *et al*, 2002:3). Die afgelope 25 jaar is reeds meer as 30 000 pasiënte na die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte (Noord-Wes Universiteit, Departement Biochemie, Potchefstroomkampus) verwys. Gedurende dié tydperk is bevind dat die voorkoms van defekte van die koolhidraatmetabolisme in die swart Suid-Afrikaanse populasie uitsonderlik hoog is, terwyl defekte van die aminosuur- en lipiedmetabolisme bykans afwesig is. Die rede vir dié tendens sal waarskynlik nooit duidelik wees nie, maar dit is nie onmoontlik dat die tendens veroorsaak kon word deur duisende jare se hoë proteïendieet en lae koolhidraatinname nie (ongepubliseerde resultate, L. J. Mienie, 2004).

Die toenemende verwestering van etniese groepe in Afrika, het tot verandering in dieet- en lewensomstandighede van die swart Suid-Afrikaanse bevolking gelei. Voorlopige navorsingsresultate dui daarop dat dit veral die koolhidraatmetabolisme is, wat geaffekteer word deur hierdie veranderinge (Levitt, 1996:43). In hierdie opsig lei die inname van verfynde suikers (vinnig vrystellende koolhidrate) en minder ru-vesel tot koolhidraatintoleransie wat voorheen minder voorgekom het. 'n Toename in die gebruik van gepreserveerde melkprodukte mag verder bydra tot die hoë voorkoms van koolhidraatdefekte in etniese gemeenskappe. Al die bostaande faktore beklemtoon die noodsaaklikheid om die koolhidraatmetabolisme te monitor. Dit is egter net moontlik as effekiewe siftingstoetse vir koolhidraatafwykings ontwikkel word (Levitt, 1996:41).

Die toenemende gebruik van medikasie plaas 'n swaar las op die detoksifiseringsprosesse in die liggaam (McLaughlin, 2000:260). Die prosesse geskied meestal in die lewer en het dus 'n indirekte invloed op die lewensnoodsaaklike metaboliese prosesse in die liggaam. Die fruktose-, galaktose- en glikogeenmetabolisme vind primêr in die lewer plaas. 'n Beskadigde lewer, as gevolg van die oormatige gebruik van medikasie, mag 'n sekondêre invloed op die koolhidraatmetabolisme tot gevolg hê (Hodgson & Levi, 1994:463). Die toenemende ondersoek in die spesifieke metaboliese defekte lei dus tot aanvraag in die ontwikkeling van doeltreffende en sensitiewer siftingsmetodes, sodat onderskeid getref kan word tussen siektes van genetiese oorsprong of siektes as gevolg van eksterne faktore.

In die studie is die doel dus om 'n effektiewe siftingsprosedure te ontwikkel om dié betrokke defekte op te spoor. Tekortkominge in dunlaagchromatografie is bevestig en die gebruik van tandem-massaspektrometrie is addisioneel aangewend om 'n meer akkurate identifikasie van urinêre koolhidrate te maak. Die tekortkominge van die massaspektrometriese analise, naamlik die onsuksesvolle deteksie van gederivatiseerde fruktose, is met behulp van 'n spektrofometriese analise van ketosuiikers aangevul. Die prosedure lei tot 'n diagnose wat voorheen onmoontlik was met behulp van dunlaagchromatografie alleen.

5.2 Dunlaagchromatografie

5.2.1 Die standaardisasie en kwalitatiewe identifikasie van koolhidrate met dunlaagchromatografie

Dunlaagchromatografie word wêreldwyd as metode gebruik om koolhidrate in uriene op te spoor. Die prosedure is betroubaar en die analise kan binne 24 uur voltooi word. Die nadeel is dat medikasiemetaboliete verwarring kan veroorsaak in die identifikasieproses. Kwantifisering van dunlaagchromatografie data is byna onmoontlik. Die enigste moontlike alternatief is 'n vorm van densitometrie wat op die beste semi-kwantitatief is. Identifikasie van individuele koolhidrate is gestandaardiseer deur standaard koolhidraatoplossings te gebruik om elke suiker se posisie op die dunlaagchromatogram te bepaal. (Sewell. 1991: 219)

In die studie is standaardisering bewerkstellig deur 'n enkel koolhidraat-standaard te analiseer, sodat korrekte identifikasie van die betrokke suiker in die urienmonsters van pasiënte kan plaasvind. Die Rf-waardes is bepaal om herhaalbare identifikasie moontlik te maak. (Sien Tabel 5.2.1.1) Die toets is kwalitatief, maar selfs identifisering mag beïnvloed word deur die konsentrasie van individuele koolhidrate. Daarom is verskeie konsentrasies koolhidrate in standaardreeks ook gebruik om die kwaliteit en beperkings van die analise te verseker en te bereken (sien Figuur 5.2.1.1).

Tabel 5.2.1.1: Die eksperimentele Rf-waardes en hul standaardafwyking sowel as die vertoonde kleur van die onderskeie suikers op die dunlaagchromatogram

Analië (Koolhidraat)	Rf-waarde en standaardafwyking	Kleur van metabolië op plaat
Glukose	0.52 ± 0.05	Ligbruin band
Galaktose	0.49 ± 0.03	Blou band
Fruktose	0.51 ± 0.06	Donkerbruin

		band
Mannose	0.40 ± 0.02	Donkerbruin band
Sukrose	0.43 ± 0.01	Bruin band
Laktose	0.30 ± 0.015	Blouerige band
Maltose	0.32 ± 0.04	Bruin band
Raffinose	0.21 ± 0.01	Bruin band
Rhamnose	0.72 ± 0.07	Donkergeel band
Trehalose	0.38 ± 0.06	Ligbruin band
Ribose	0.58 ± 0.01	Blou band
Arabinose	0.53 ± 0.09	Blou band
Xilose	0.62 ± 0.03	Blou band

Die gebruik van die Rf-waarde in die wetenskaplike identifikasie van 'n spesifieke analiet op die chromatogram, kan soos volg voorgestel word:

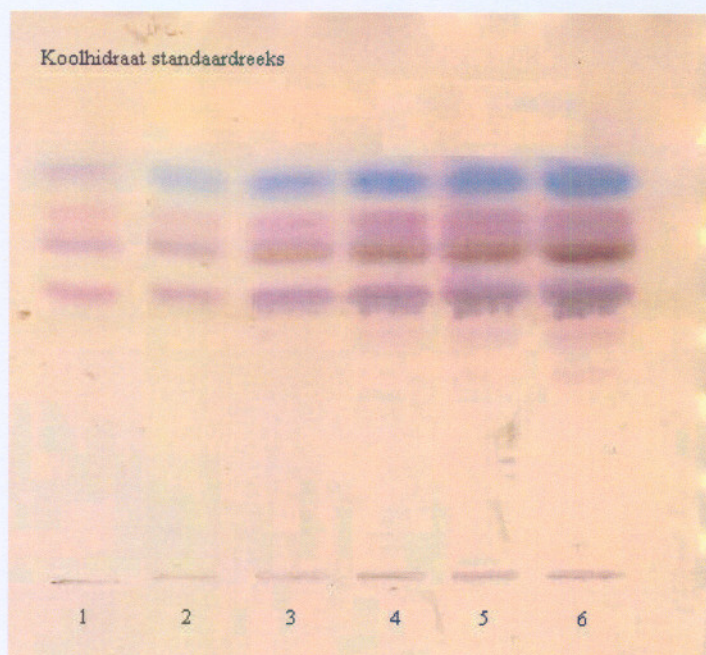
Chromatogram van figuur 5.2.1.1: Baan 4:

$$\begin{aligned}
 \text{Galaktose Rf-waarde}_{\text{standaard}} &= \text{Afstand van die analiet/afstand van loopmiddel} \\
 &= 30\text{cm}/59\text{cm} \\
 &= 0.5
 \end{aligned}$$

Die gebruik van die Rf-waardes om koolhidrate in urienmonsters te analiseer, sal in paragraaf 5.2.2. geïllustreer word. Die gebruik van Rf-waardes saam met die kleurverskille van analiete op die dunlaagchromatogram, is die eerste stap in die identifikasie van 'n koolhidraatafwyking. Die posisie van elke koolhidraat-molekuul op die chromatogram, hang af van massa en struktuur. Die hoë betroubaarheid van teoretiese Rf-waardes word in die resultate weerspieël. Dit is nie moontlik om suikeralkohole met die tegniek te analiseer nie, want die kleuringsproses geskied met behulp van die keto- of aldehydegroep, wat die suikeralkohole nie besit nie.

Standaardisering van die dunlaagchromatografie het ook grootliks afgehang van die konsentrasie limiete van die betrokke metode. Figuur 5.2.1.1 stel 'n konsentrasiereeks van 'n standaardoplossing voor. Uit die figuur is dit duidelik dat identifikasie bemoeilik word deur te lae en/of te hoë konsentrasie. Die ideale konsentrasiegebied is tussen 3mM en 9mM.

Die voordeel is egter dat absolute identifikasie nie altyd nodig is vir die sifting van 'n koolhidraatdefek nie. Die teenwoordigheid van koolhidrate op die chromatogram, behalwe glukose, lei outomaties tot die gevolgtrekking dat daar wel 'n moontlike koolhidraatafwyking is. Dit het tot gevolg dat gevorderde analyses noodsaaklik is as bevestiging van die betrokke analise. In die geval van baie hoë konsentrasie suikers in die uriene, is 'n verdunning van die betrokke monster gebruik vir die analise. Van die probleme kan dus oorkom word, maar die analisering van koolhidrate, met behulp van dunlaagchromatografie, bly steeds onbetroubaar en onsensitief (ongepubliseerde resultate, L.J. Mienie, 2004).



Figuur 5.2.1.1: Koolhidraat standaardreeks. Die chromatogram is slegs ter illustrasie van die konsentrasieverskille op die chromatogram. Slegs sekere standaard, naamlik (van onder af) laktose, sukrose, galaktose, glukose en xilose is op die chromatogram teenwoordig: baan 1) 0.5mM; baan 2) 1mM; baan 3) 3mM; baan 4) 6mM; baan 5) 9mM; en baan 6) 12mM.

5.2.2 Identifikasie van potensiële koolhidraatafwykings met behulp van dunlaagchromatografie

'n Groot groep pasiënte is in die siftingprosedure gebruik om moontlike koolhidraatafwykings te bepaal. Bo en behalwe bekende pasiënte met bekende defekte van die koolhidraatmetabolisme, is pasiënte met kroniese siektetoestande soos Parkinsonisme (pasiënte met simptome van Parkinson se siekte) en ADHD ook ingesluit. Laasgenoemde twee groepe pasiënte het nie ooglopende defekte van die koolhidraatmetabolisme nie. Maar omrede die koolhidraatmetabolisme weefselspesifiek is en aanvaar word dat die twee defekte die metabolisme van die brein aantast, is dit ingesluit met die doel om terselfdertyd vas te stel of 'n verandering van metabolisme in die brein enige verandering van die koolhidraatprofiel in die uriene veroorsaak.

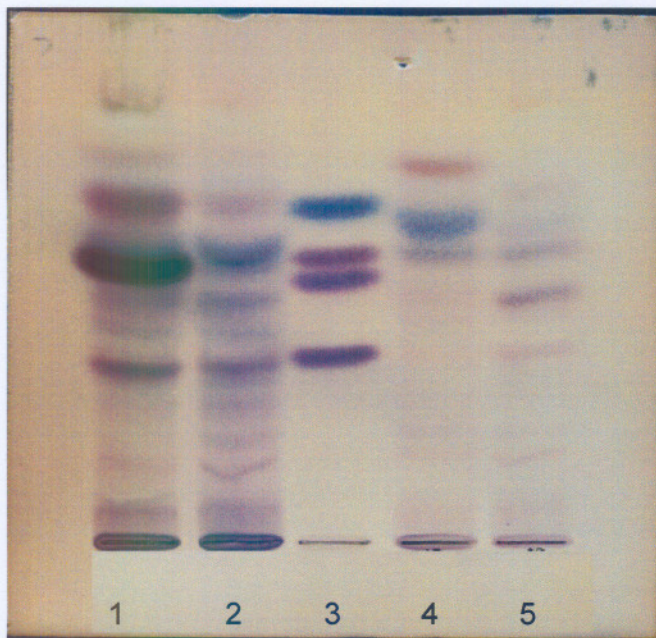
In dié afdeling was die tekortkominge van die huidige gebruikte tegnieke (dunlaagchromatografie) duidelik waarneembaar. Die limiete vir die gebruik van die Rf-waarde sowel as die verskille in konsentrasies van die koolhidrate en die betrokke siektes is net 'n paar probleme wat waargeneem is.

5.2.2.1 Urinêre koolhidraatprofile van bekende metaboliese koolhidraatdefekte

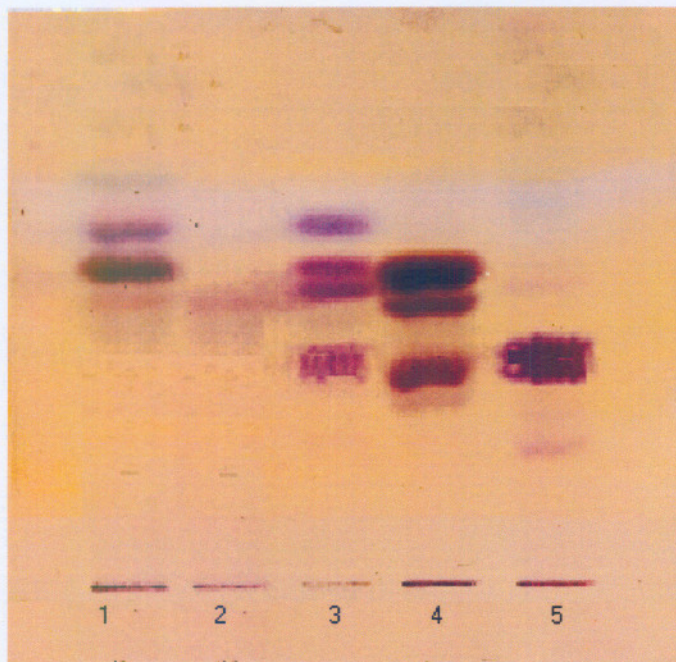
Uriene van pasiënte met bekende aangebore metaboliese siektes van die koolhidraatmetabolisme, is in die studie gebruik. 'n Duidelike onderskeid tussen galaktosemie, fruktosurie, glikogeenstoringsiektes en die komplekse lisosomale storingsiektes is waarneembaar op die chromatogramme. Die Rf-waarde is in die identifikasie van sommige analiete op die chromatogram gebruik. In seker gevalle, soos byvoorbeeld by glikogeenstoringsiektes, moet die algehele koolhidraat-"patroon" op die chromatogram in ag geneem word om 'n siektetoestand te identifiseer. Aangesien komplekse suikers nie kommersieel beskikbaar is nie, kon geen Rf-waarde vir dié spesifieke verbindings bepaal word nie. Die analise van positiewe kontroles gee dus 'n aanduiding van moontlike glikogeen- of lisosomale storingsiektes, maar komplekse analises is steeds nodig vir bevestiging.



Figuur 5.2.2.1.1: Koolhidraatprofiel van bekende metaboolse defekte. 1) en 2) Glykogenstoringsiekte; 3) Standaard; 4,5) Galaktosemie a en Galaktosemie b.



Figuur 5.2.2.1.2: Koolhidraatprofiel van bekende metaboolse defekte. 1) Fruktosurie; 2) Fruktose 1,6-bifosfatase defek 3) Standaard; 4 & 5) Glykosileringsdefek.



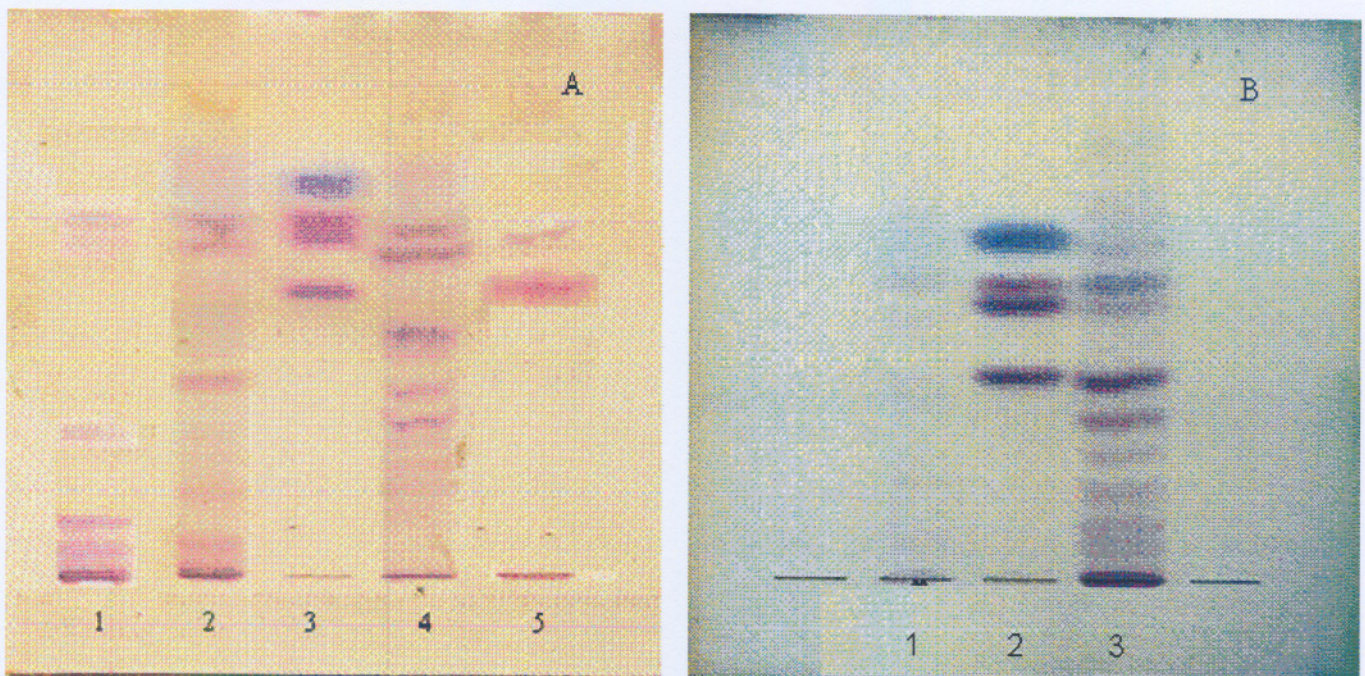
Figuur 5.2.2.1.3: Koolhidraat-profiel van bekende metabooliese defekte. 1) Milde Pentosurie; 2) Kontrolepasiënt; 3) Standaard; 4) Diabeet; 5) Laktose intoleransie.

Tabel 5.2.2.1.1: Die gebruik van die Rf-waardes vir koolhidraat identifikasie

Pasiënt	Metabooliet	Standaard-Rf-waarde	Eksperimentele Rf-waarde
Galaktosemie A – (Fig 5.2.2.1.1: baan 4)	Galaktose	0.49	0.500
Galaktosemie B – (Fig 5.2.2.1.1: baan 5)	Galaktose	0.49	0.510
Fruktose 1,6-bifosfatase defek (Fig 5.2.2.1.2: baan 2)	Fruktose	0.51	0.517
Fruktosurie (Fig 5.2.2.1.2: baan 2)	Fruktose	0.51	0.512
Laktose intoleransie (Fig 5.2.2.1.3 : baan 5)	Laktose	0.38	0.378
Matige Pentosuria (Fig 5.2.2.1.3: baan 1)	Xilose	0.63	0.63
Diabeet (Fig 5.2.2.1.3: baan 4)	Glukose	0.54	0.539

Die gebruik van die Rf-waarde is nie altyd betroubaar om spesifieke koolhidrate te identifiseer nie. Dit is ook afhanklik van die spesifieke dunlaagplate wat gebruik word. Standaard Rf-waardes moet dus afsonderlike vir elke plaat bereken word en nie net as standaard aanvaar word nie. As gevolg van verwarring wat ontstaan, is addisionele analises nodig om die betrokke Rf-waarde identifikasie te bevestig.

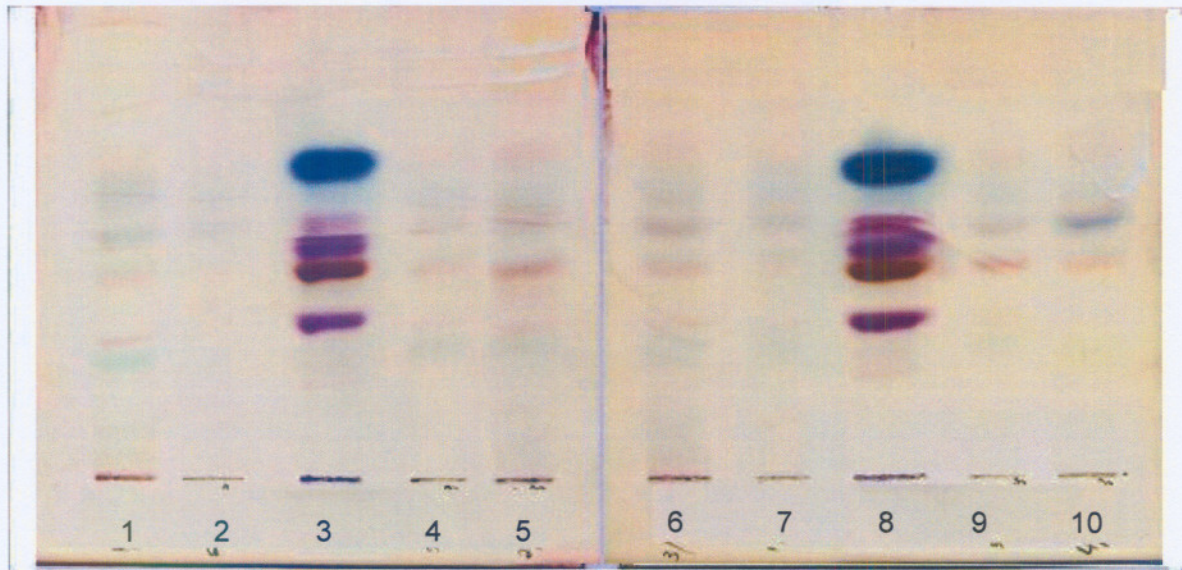
Komplekse koolhidraatdefekte lewer 'n unieke "patroon" op die dunlaagchromatogram. Urinêre suiker by pasiënte met moontlike oligosakkaridose is gewoonlik suikerderivate (soos aminosuikers) of lang vertakte oligosakkariede. Die identifikasie van die koolhidrate is dus onmoontlik met behulp van die Rf-waarde. Figuur 5.2.2.1.4 stel die betrokke siektes voor.



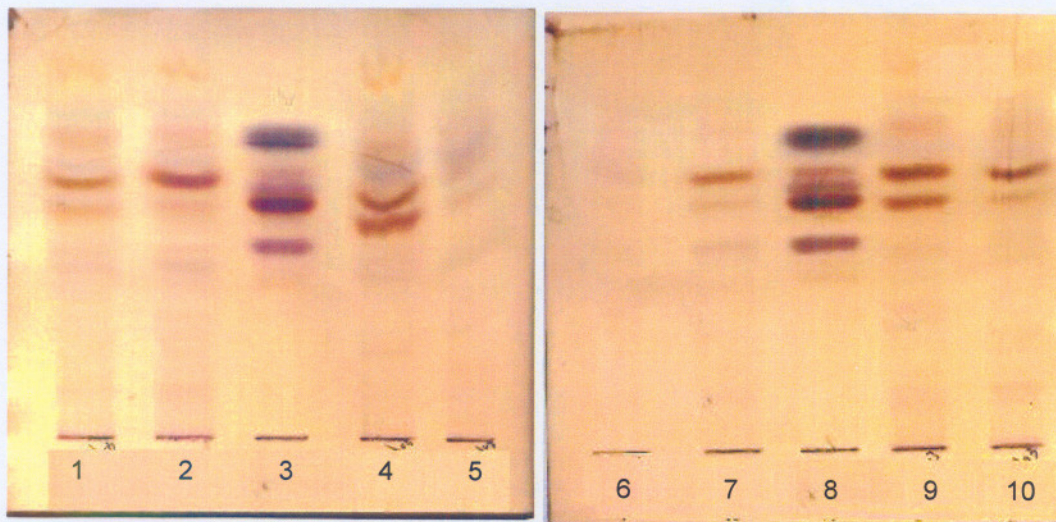
Figuur 5.2.2.1.4: Lisosomale storingsiektes. A, 1) G_{M1}-Gangliosidase defek; 2) Fukosidose defek ; 3) Standaard; 4) α-Mannosidose defek; 5) β-Mannosidose defek. B) 1) Kontrolemonster (geen koolhidraatdefek); 2) Standaard; 3) Fukosidose defek.

5.2.2.2 Urinêre koolhidraatprofiele van nie-verwante koolhidraatsiektes

Defekte van die koolhidraatmetabolisme word in die nuutste literatuur geïmpliseer in verskeie kroniese siektetoestande wat Alheimers, Parkinsonisme en ADHD insluit. Die toestande word as multifaktoriale siektes bestempel (Mazzio & Soliman, 2003:137 en Murphy, *et al.*, 2004:981). Dit wil sê dat genetiese oorerflikheid, eksterne faktore (soos dieet) en simptome, as gevolg van mikrobiële aktiwiteit, kan bydra tot die siektetoestande. Die invloed van die koolhidraatmetabolisme se status op dié tipe siektetoestande word tans in verskeie gevalle ondersoek (Haup & Newcomer, 2002:925). In hierdie afdeling is die koolhidraatprofiele van ADHD en Parkinsonisme pasiënte bestudeer en word in figuur 5.2.2.2.1 aangedui.



Figuur 5.2.2.2.1: Koolhidraatprofiel van pasiënte met simptome van Parkinsonisme (Bane 1,4,5,6,7,9 en baan 10: Pasiënte met parkinsonisme; baan 2: kontrolepasiënt; bane 3 en 8 : standarde.)



Figuur 5.2.2.2.2: ADHD-pasiënte se koolhidraatprofiel. 'n Duidelike koolhidraat abnormaliteit bestaan. Sukrose en glukose is in elke ADHD-pasiënt se urienmonster teenwoordig; (Bane 1,2,4,5,7,9 en 10: ADHD-pasiënte; baan 6: kontrolepasiënt; bane 3 en 8: standaarde.

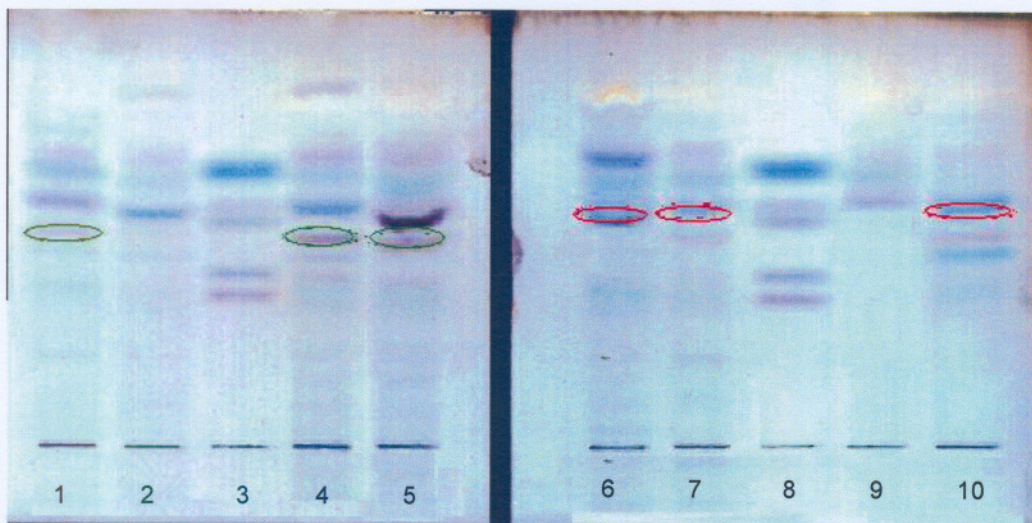
'n Duidelike koolhidraat-“patroon” is waarneembaar by die twee siektetoestande. Beide monosakkariede en disakkariede is in die uriene teenwoordig (Sien figuur 5.2.2.2.2). Daar moet ook in ag geneem word dat die pasiënte wel medikasie inneem, wat 'n invloed op die chromatografiese skeiding mag hê. Tot dusver kon geen kliniese korrelasie tussen die teenwoordigheid van die suikers en simptome van die betrokke pasiënte gemaak word nie. In die toekoms kan sulke koolhidraatpatrone moontlik betekenisvol in die identifikasie van multifaktoriale siektes wees.

5.2.3 Die invloed van medikasie op die interpretasie van die dunlaagchromatografie resultaat

Dit is verder belangrik om ander moontlike verbindings, wat 'n invloed mag hê op die analise, te identifiseer. Uriene van 20 pasiënte wat Valproaat en Parasetamol ingeneem het en geen bekende koolhidraatafwyking vertoon het nie, is gebruik. Die ondersoek na

medikasie se invloed is gedoen na aanleiding van herhaalde analisering van pasiënte se uriene in die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Afwykings in Suid-Afrika (ongepubliseerde resultaat, L J Mienie, 2004). Die analyses het 'n verband tussen die inname van seker medikasie en 'n unieke koolhidraatprofiel getoon.

Nadele van die tegniek is dat medikasiemetaboliete kan lei tot 'n vals positiewe resultaat. Vanuit figuur 5.2.3.1 wil dit voorkom of Parasetamol 'n blouerige "band" op die posisie van fruktose (tussen galaktose en glukose) lewer. Valproaat lewer 'n ligte bruin "band" op die posisie van sukrose. Die R-f-waardes word in tabel 5.2.3.1 weergegee. Dit is dus belangrik dat die medikasie wat die pasiënt inneem, bekend is om in die finale diagnose in oorweging geneem te word.

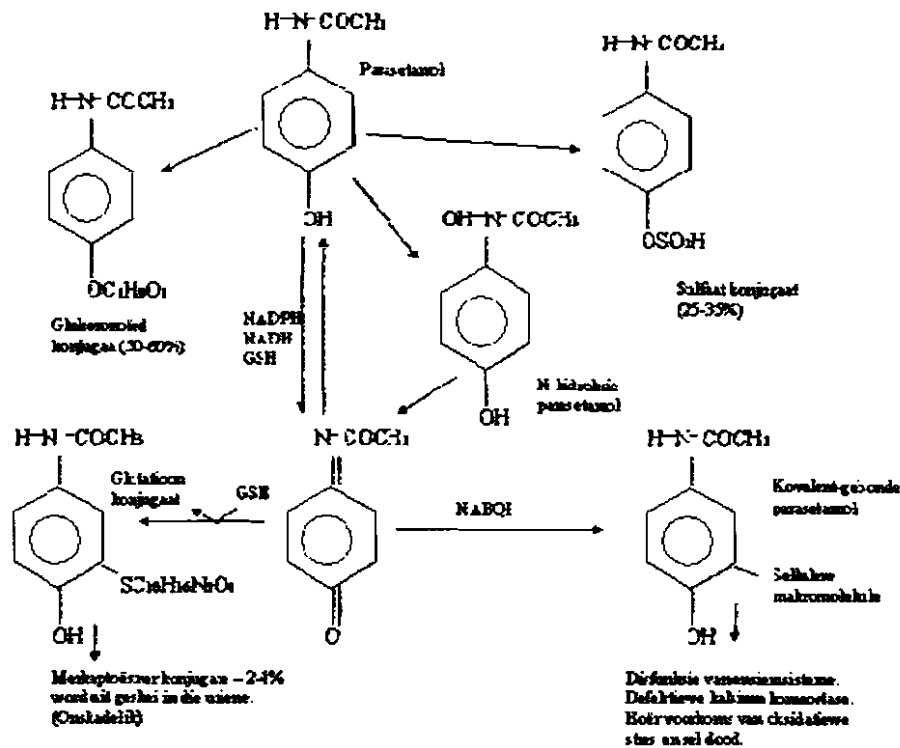


Figuur 5.2.3.1: Die invloed van medikasie op dunlaagchromatografie van koolhidrate. Bane 1, 4 en 5: pasiënte wat valproaat inneem; bane 2 & 9: kontrolepasiënt; bane 3 & 8: standaardoplossing; Bane 6, 7 en 10: pasiënte wat Parasetamol inneem.

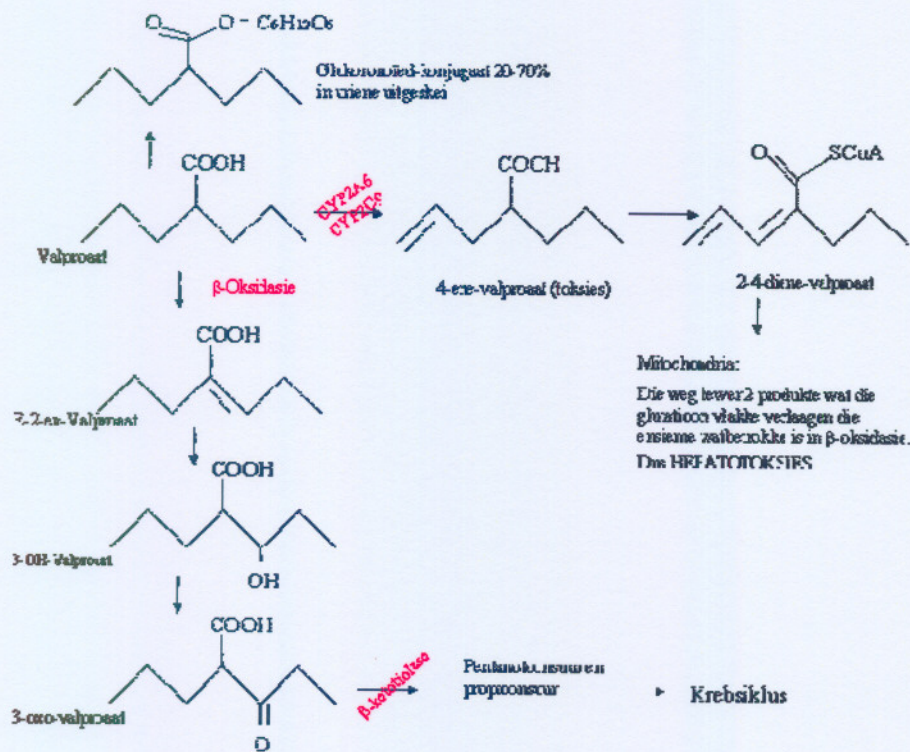
Tabel 5.2.3.1: Rf-Waardes van medikasiemetaboliete:

Medikasiemetabolite	Rf-waarde
Valproaat	0.43 ± 0.03 (Bruin band)
Parasetamol	0.5 ± 0.02 (Blou band)
Kunsmatige versoeters	0.88 ± 0.1 (Geel tot bruin band)

Medikasiemetaboliete is waarneembaar op die dunlaagchromatogramme as gevolg van struktuurverwantskappe aan koolhidrate. Parasetamol en Valproaat word deur die liggaam gemetaboliseer en die metaboliete in figure 5.2.3.2 en 5.2.3.3 word in die uriene uitgeskei. Daar word gespekuleer dat ketogroepe op die sekondêre Parasetamol- en sekondêre Valproaatmetaboliete reageer met die orsinol kleuringsreagens, om sodoende bande op die chromatogram te toon. Die feite is slegs 'n moontlike verklaring. Nog geen bewyse is gelewer nie.



Figuur 5.2.3.2: Metabolisering en detoksifisering van Parasetamol in die menslike liggaam. In drie van die verbindings is ketogroepe en aldehydegroepe beskikbaar vir die reaksie met orsinol. Die skematiese voorstelling verklaar dus moontlik die Parasetamolbande wat teenwoordig is op die dunlaagchromatogramme (Heitmeier & Blaschke, 1999:94).



Figuur 5.2.3.3: Metabolisering en Valproaat in die menslike liggaam. Die glukuronooïed-konjugaat is heel moontlik die metaboliet wat waargeneem word op die dunlaagchromatogram (McLaughlin *et al.*, 2000:260).

5.3 MS-MS en LC-MS-MS analisering van PMP-gederivatiseerde koolhidrate

5.3.1 Historiese agtergrond

Massaspektrometrie is vir die laaste 10 jaar in diagnostiese identifikasie van genetiese siektes gebruik. Tandem-massaspektrometrie en elektrospoei ionisasie het die analiseringstyd dramaties verkort (2-3 minute). Selfs die voorbereidingstydperk word in sekere analyses drasties verkort, naamlik 2-3 ure. Aminosuururie, organiesesuururie en β -oksidase defekte is van die defekte wat opspoorbaar is met massaspektrometrie. Verskeie tipe monsters kan gebruik word in die betrokke identifikasieproses, naamlik Guthrie kaartjies (bloed op filtreerpapier), urienmonsters en serummonsters. Meer tradisionele analitiese tegnieke toon lae sensitiwiteit en spesifisiteit, soms vals positiewe resultate en 'n breedvoerige monster voorbereiding (Hardy, 1999:11).

Massaspektrometrie (MS) is 'n analitiese tegniek vir die identifikasie van verbindings op grond van hulle massa en lading. Bombardering deur elektrone met behulp van laseradsorpsie en elektrospoei ionisasie (sagte ionisie) word gebruik om die toepaslike analiet te fragmenteer - om sodoende 'n unieke spektrum te lewer. Hieruit kan daar dus afgelei word wat die samestelling van sekere mengsels is (Hardy, 1999:13).

Organiesesure en aminosure bevat funksionele groepe wat bydra tot die identifikasie deur die MS. Koolhidrate is egter 'n verbinding wat slegs onder ekstreme kondisies soos hoë pH en temperatuur, 'n lading besit. Die struktuur mag ook stoïgiometries verskil, naamlik piranose vorm en aldose vorm. Die eienskappe van die molekule maak dit moeilik om te analiseer sonder chemiese modifikasie aan die betrokke verbindings. Derivatisering is dus 'n oplossing. In die studie is daar gebruik gemaak van PMP as derivatiseringsreagens onder alkaliese toestande (sien Figuur 4.3.1).

5.3.2 Standaardisasie van die derivatiseringsmetode en massaspektrometriese kondisies

Optimale derivatiseringskondisies is verkry met 0.4 M ammoniumhidroksied en 0.25M PMP. Te hoë ammoniumhidroksied-konsentrasie veroorsaak hidrolise (disintegrasie van polimere na monomere) van disakkariede en oligosakkariede. Lae ammonium-hidroksied konsentrasies verhoed weer volledige derivatisering. Die kondisies stem ooreen met die van Rozaklis *et al.* (2001:132). Fruktose, sukrose en raffinose lewer geen PMP-derivate nie. Dit is weens die onvermoë van die ketosering om met PMP te reageer. Mono-, di- en oligosakkariede is individueel met behulp van direkte inspuiting deur die tandem-MS geanaliseer om die moeder- en dogterioon van die koolhidraatderivate te bepaal.

Kommersiële standaarde is afsonderlik gederiviseer en voorberei vir die MS-MS analisering. Tydens MS-MS analisering is moederione (pseudo-molekulêre ione) met 'n unieke dogterioon van 175 m/z opgemerk. Die waarneming is bevestig deur Rozaklis *et al.* (2002:131). Die volgende tabel stel die pseudo-molekulêre ioon en dogterione van die betrokke koolhidrate voor. Die oligosakkaried massas is verkry tydens die analisering van maltodekstrien. Tabel 5.3.2.1 stel verskeie koolhidrate en hul dogter-en moederione voor. Die spektra van elke koolhidraatverbinding stem ooreen met waardes wat deur Rozaklis *et al.* (2002:131) gepubliseer is.

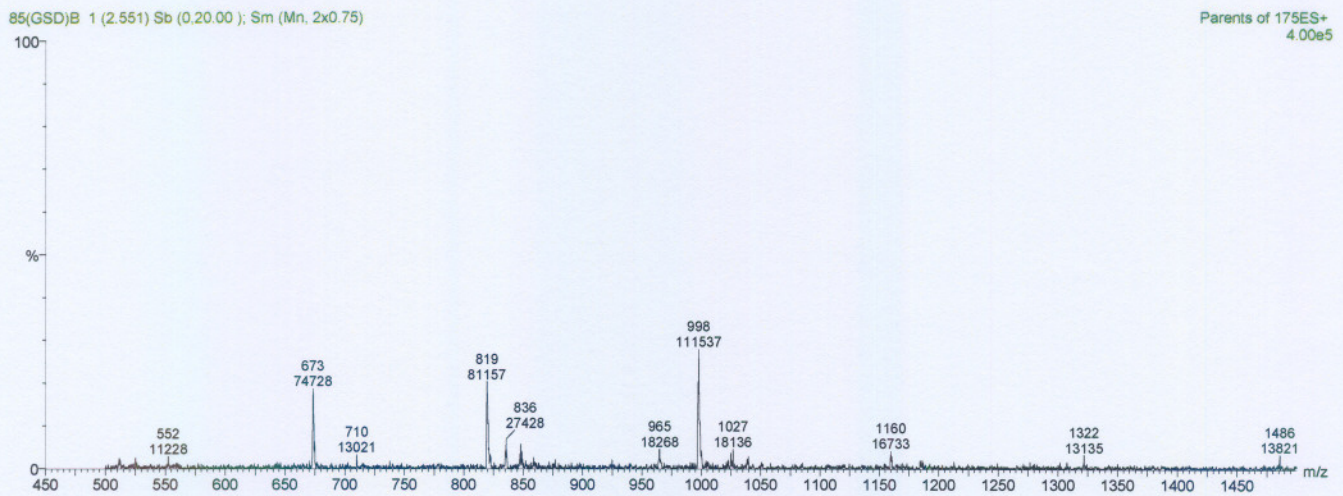
Tabel 5.3.2.1: Die dogter- en moederione (pseudo-molekulêre ione) van die onderskeie koolhidraat-PMP-derivate.

Koolhidraat-derivaat	Dogterioon m/z	Pseudo-molekulêre ioon m/z
Pentose suikers: xilose en ribose	175	481.2
Heksose suiker: galaktose, mannose, glukose	175	511.2
Rhamnose (IS)	175	495.2
Disakkariede: laktose en maltose	175	673.2
Trisakkariede	175	835.2
Tetrasakkariede	175	997.3
Heksose ₅	175	1159.3
Heksose ₆	175	1321.3
Heksose ₇	175	1483.3

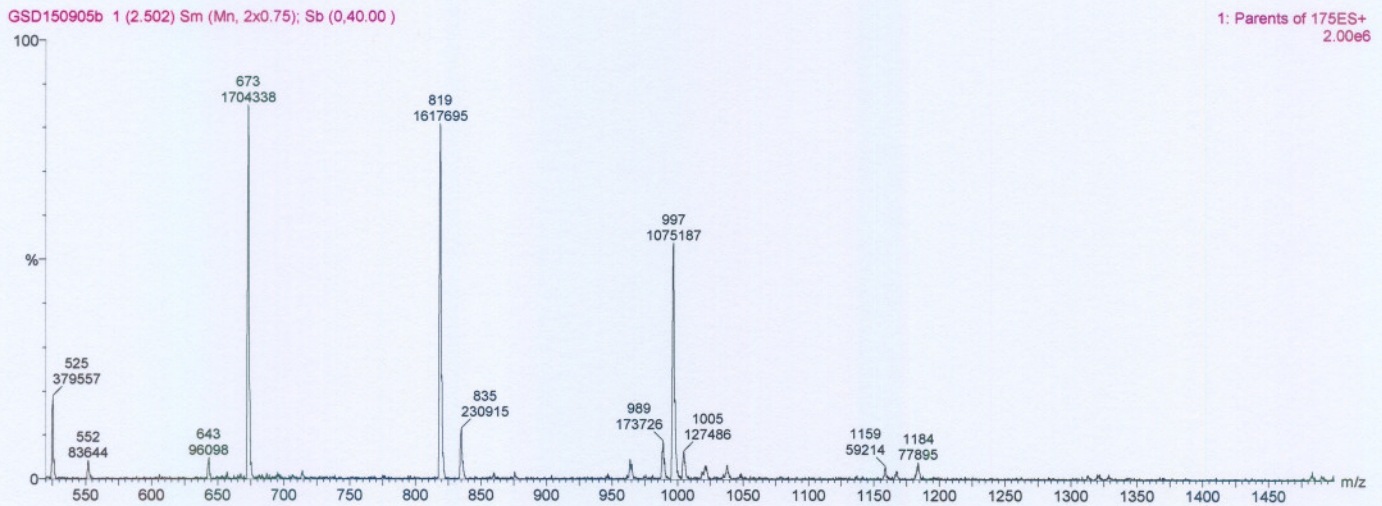
5.3.3 Standaardisasie van die ekstraksie- en analiseringsmetode van PMP koolhidraatderivate uit uriene

5.3.3.1 Ekstraksie met en sonder soliede fase ekstraksie (C18 kolommetjies)

'n C18 soliede fase ekstraksie was nodig vir die isolering van PMP-derivate sowel as die ekstraksie van oortollige ongereageerde PMP. Tydens die MS-MS analisering van die derivate is effektiewer ionisasie ten opsigte van die relavante molekules bereik en verbeterde sensitiwiteit is verkry. Figure 5.3.3.1.1 en 5.3.3.1.2 vertoon die verskille tussen voorbereiding met en sonder soliede fase ekstraksie.



Figuur 5.3.3.1.1: Ekstraksie van oligosakkariede met geen soliede fase ekstraksie (C 18 SPE stap).

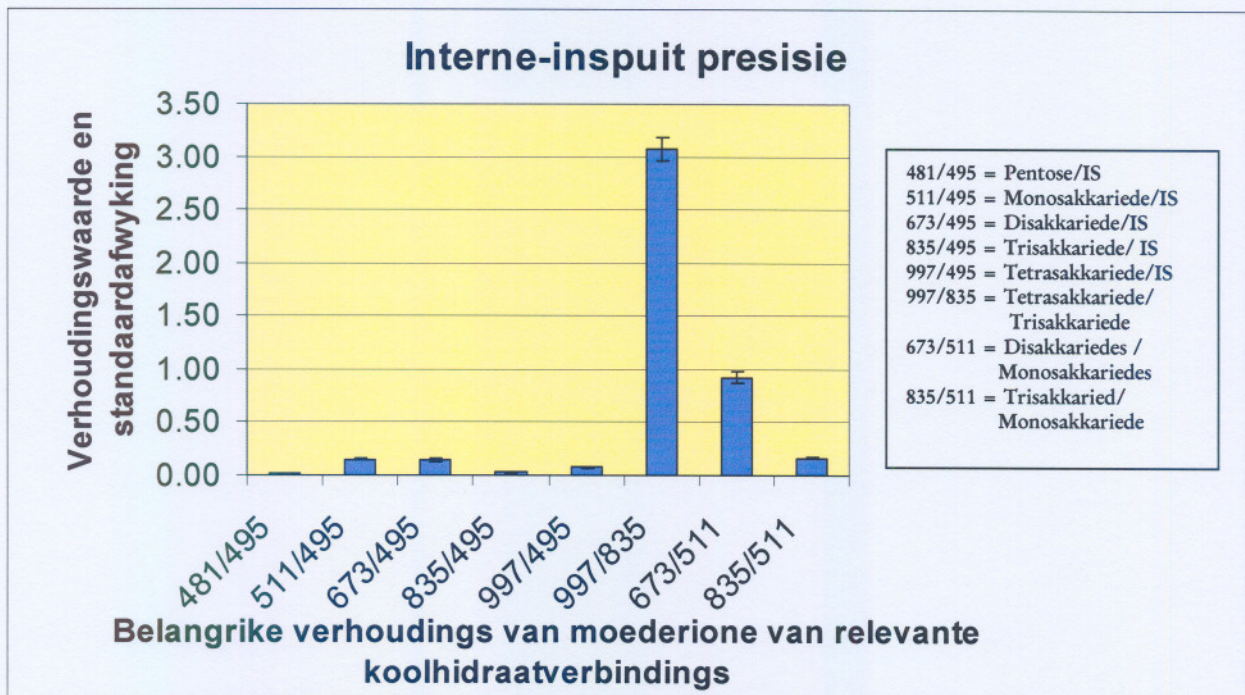


Figuur 5.3.3.1.2: Ekstraksie met behulp van soliede fase ekstraksiestap (C18 SPE stap).

5.3.3.2 Presisie

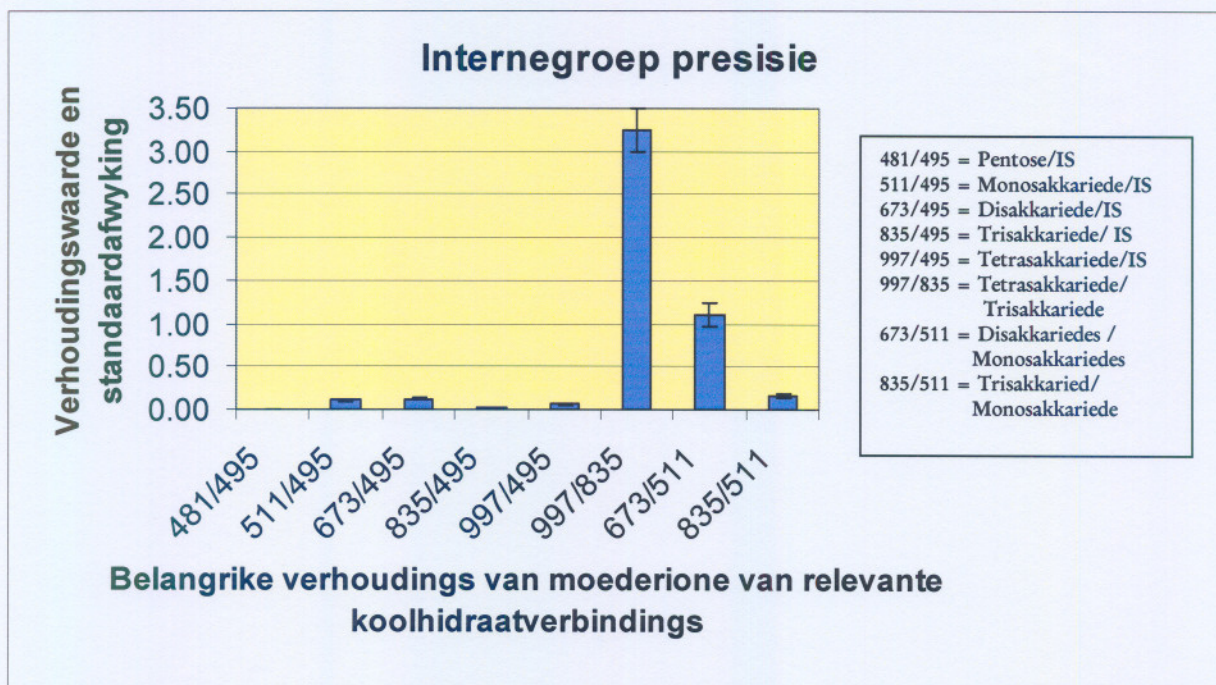
Die gebruik van die tandem-MS metode, as deel van 'n betroubare siftingsprosedure van koolhidraatdefekte, hang grootliks af van die betroubaarheid van resultate wat verkry word. Die volgende resultate dui die presisie van die tandem -MS se werking sowel as die presisie in die voorbereiding van die monster aan, wat aan die analise blootgestel word. Presisie beskryf die vergelyking van datapunte wat verkry is met behulp van presies dieselfde analise (Skoog *et al* 1996:13). Verdere betroubaarheid in die metode is verkry deur groepsanalises te doen saam met positiewe kontroles (pasiënte met 'n definitiewe koolhidraatdefek), negatiewe kontroles (pasiënte met geen koolhidraatdefek) en standaardkontroles (monsters met bekende konsentrasie koolhidrate).

5.3.3.2.1 Interne-inspuit presisie van die MS-MS is bepaal deur die monster herhaaldelik uit dieselfde put te spuit. Die volgende figuur toon die herhaalbaarheid van die inspuitstelsel, sowel as die werking van die tandem MS aan (Hardy, 1999:24).



Figuur 5.3.3.2.1: Grafiese voorstelling van die interne-inspuit presisie. Die relevante koolhidraatverbindinge word uitgedruk in terme van die interne standaard.

5.3.3.2.2 *Internegroep-presisie* is bepaal deur dieselfde monster 5 keer voor te berei en in aparte putte te plaas en dan te analiseer. Die metode bevestig die presisie van die voorbereiding sowel as die funksionering van die apparaat (Hardy, 1999:24)



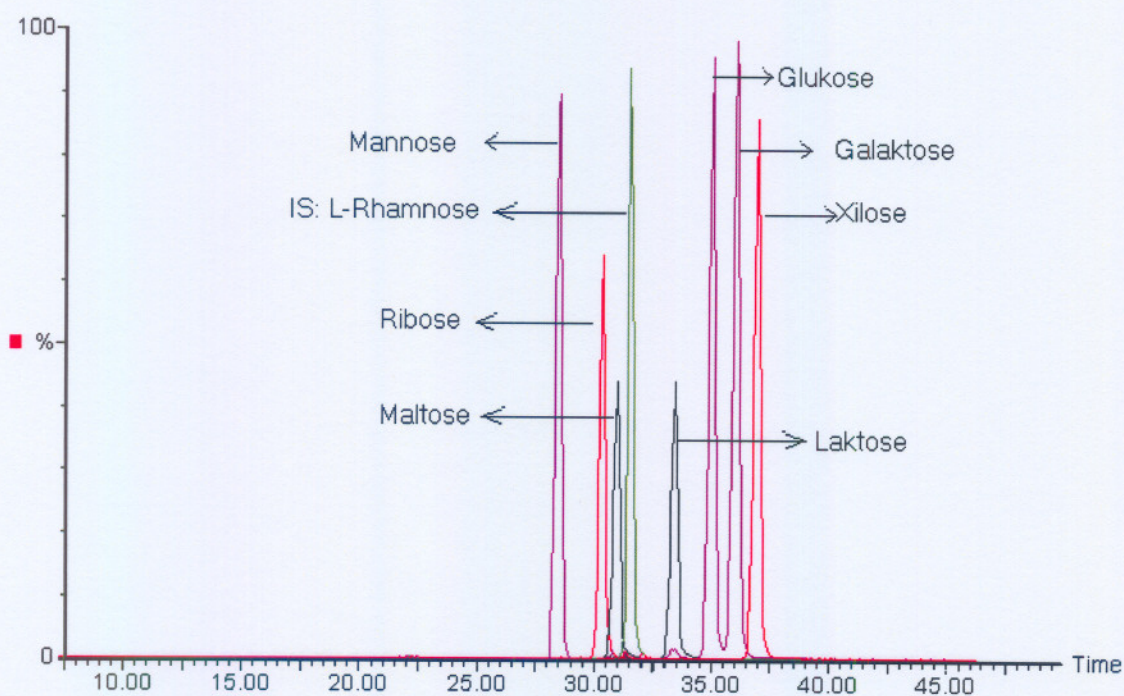
Figuur 5.3.3.2.2: Grafiese voorstelling van die internegroep-presisie. Die relevante koolhidraatverbinding word uitgedruk in terme van die interne standaard.

5.3.3.3 Die analisering van mono- en disakkariedes met behulp van LC-MS-MS

Die omgekeerde fase chromatografie skei molekules, wat struktureel verwant is, effektief. Die analise word uitgevoer nadat 'n abnormale dunlaagchromatogram sowel as abnormale vlakke mono- en disakkariede tydens die aanvanklike MS-skandering waargeneem is. Die chromatografiese analise word dus slegs gebruik in die identifikasie van eenvoudiger suikers in die uriene. Siektes soos galaktosemie en laktose intoleransie kan dus met die analise bevestig word.

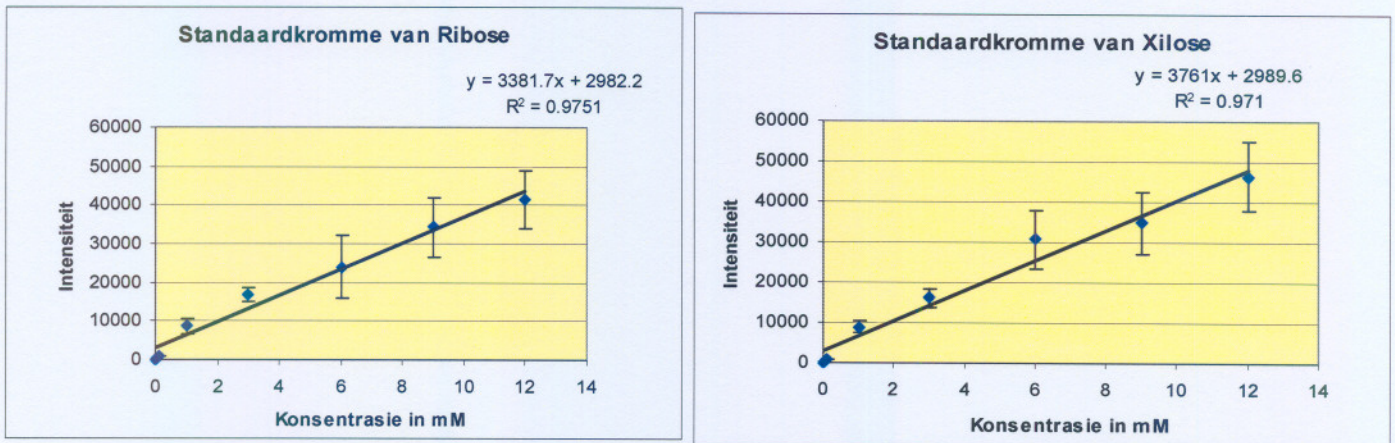
Die struktureel verwante molekules kan dus met behulp van die kombinasie van vloeistofchromatografie en tandem massaspektrometrie geïdentifiseer word. Identifikasie geskied op grond van retensietyd sowel as met behulp van 'n gemeenskaplik dogterioon (175m/z) en unieke moederione (pseudo-molekulêre ione). 'n Mate van kontrole word behou deur monsters te vergelyk (wat bestaan uit onbekende eenvoudige suikers) met die analise van 'n standaardoplossing waarvan die verbindings sowel as die retensietyd bekend is. Die standaard is elke keer saam met die onbekende monsters geanaliseer, aangesien verandering in eksterne kondisies wel variasie in retensietye mag veroorsaak.

Die standaard LC-MS-MS chromatogram van PMP-derivate word in Figuur 5.3.3.3.1 voorgestel. Die konsentrasie van die standaard is 5mM. 'n Duidelike onderskeid tussen monosakkariede - naamlik galaktose, glukose en mannose is waarneembaar. Die sensitiwiteit ten opsigte van disakkariede is gering laer as vir monosakkariede. Vir die studie is dit egter nie van belang nie, want die gebruik van die chromatografiese skeiding is slegs vir identifikasiedoeleindes.

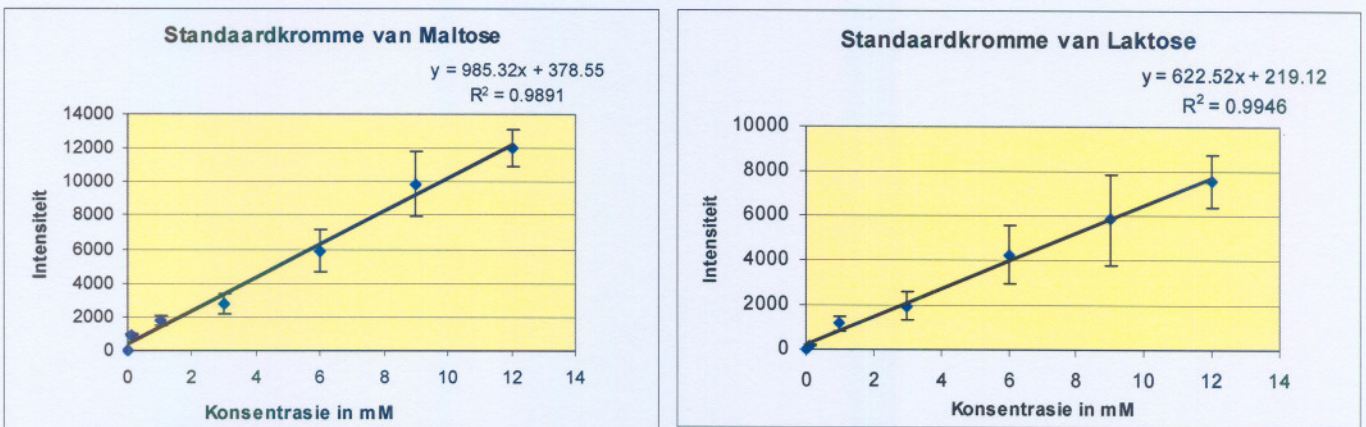


Figuur 5.3.3.3.1: Chromatografiese skeiding van mono- en disakkariedderivate met behulp van LC-MS-MS.

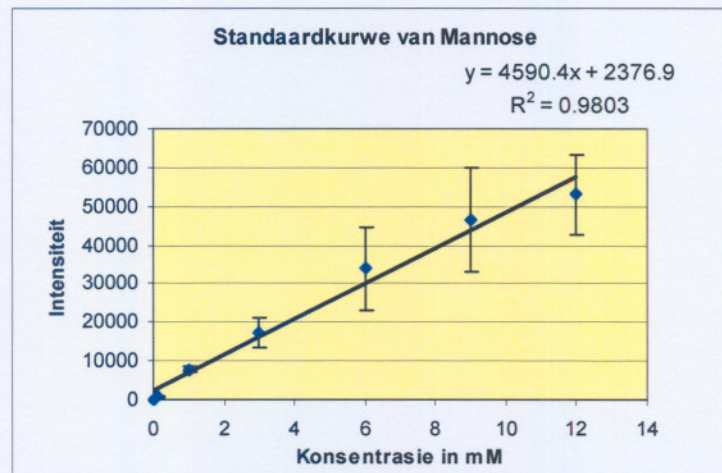
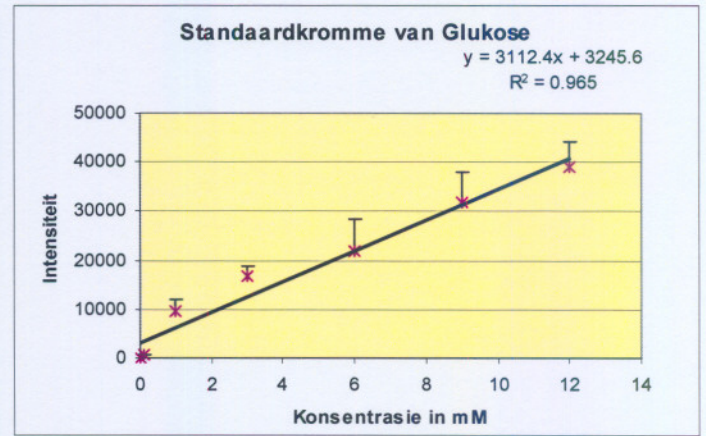
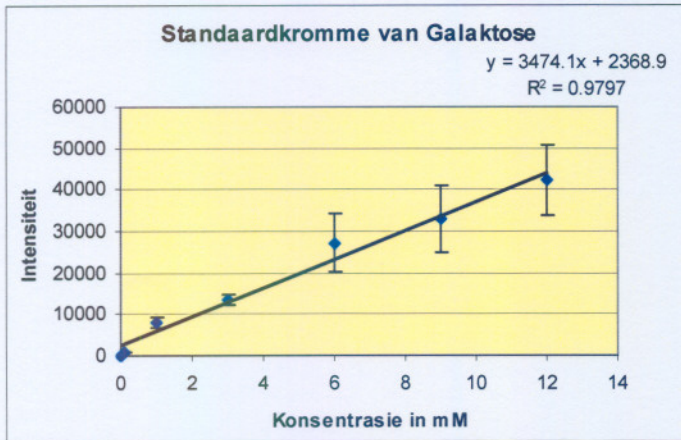
Aangesien die analitiese tegniek slegs gebruik word om die MS-MS-skandering en dunlaagchromatografie te bevestig, is die presisie van die data nie in ag geneem nie. Daar is wel gekonsentreer op die detekselimiete sowel as die liniêre regressie van die data. 'n Konsentrasiereeks (0.1mM tot 12 mM) is voorberei. Sodoende kan die sensitiviteit vergelyk word met dié van die dunlaagchromatografie. Die grafieke in figure 5.3.3.3.2., 5.3.3.3.3, 5.3.3.3.4 en 5.3.3.3.5 stel die verskeie suikers en data daarvan voor.



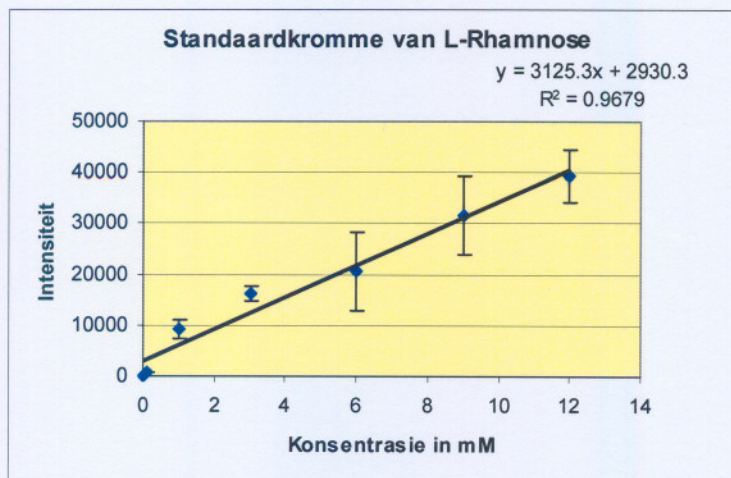
Figuur 5.3.3.3.2: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van Pentose suikers: xilose en ribose.



Figuur 5.3.3.3.3: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van disakkariedsuikers: laktose en maltose



Figuur 5.3.3.3.4: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van monosakkariede (aldose suikers), naamlik galaktose, glukose en mannose, is waarneembaar.



Figuur 5.3.3.3.5: Grafiese voorstelling van die standaardkromme van die interne standaard: L-Rhamnose.

5.3.4 Die gebruik van tandem-massaspektrometrie as addisionele siftingsprosedure van koolhidraatmetaboliese defekte

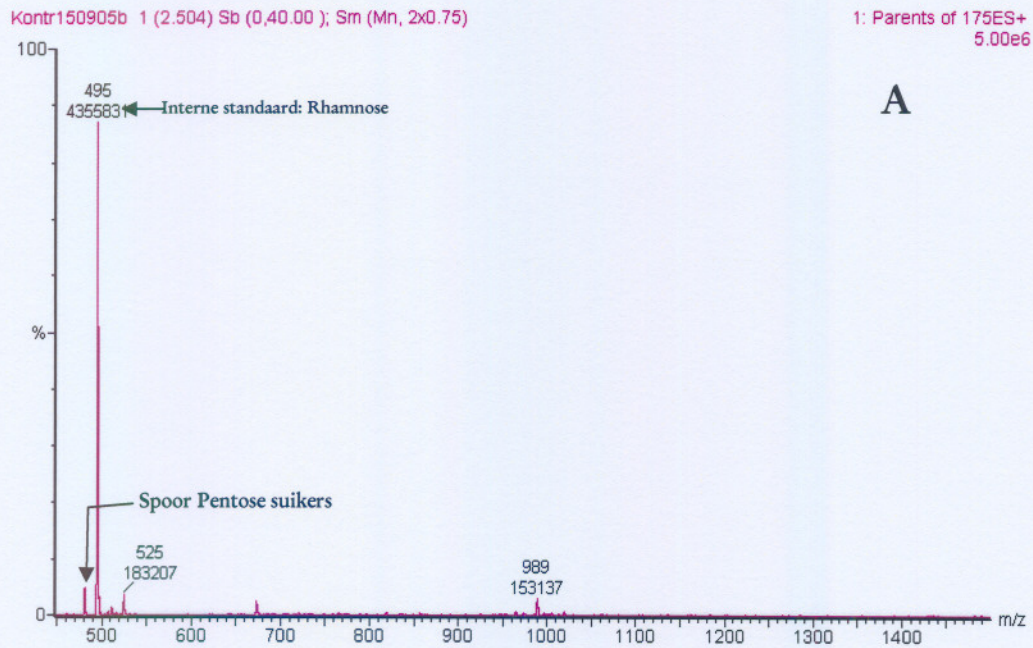
Die vinnige voorbereidingstyd, betroubaarheid en sensitiwiteit van die analisering van PMP derivate met behulp van die MS-MS en LC-MS-MS, maak die tegniek geskik vir diagnostiese doeleindes. Daar moet egter beklemtoon word dat die tegniek nie kwantitatief aangewend kan word nie en dat resultate altyd ensiematies bevestig moet word.

Verskeie siektes soos galaktosemie, glikogeenstoringsiektes en pentosurie is 'n paar van die vernaamste siektes wat suksesvol in die studie geïdentifiseer is. Die Tandem-MS kan dus nou gebruik word in die sifting van potensiële dodelike genetiese afwykings, sodat die pasiënt se lewenskwaliteit kan verbeter met die nodige intervensie. Die interpretasie van die MS-MS en LC-MS-MS resultate is van groot belang. Die rou data word nie kwantitatief aangewend nie. Die verhouding van die koolhidrate teenoor die interne standaard sowel as teenoor ander koolhidrate, is gebruik in die potensiële identifisering van 'n koolhidraatdefek. Belangrike verhoudings is reeds in die literatuur genoteer, naamlik:

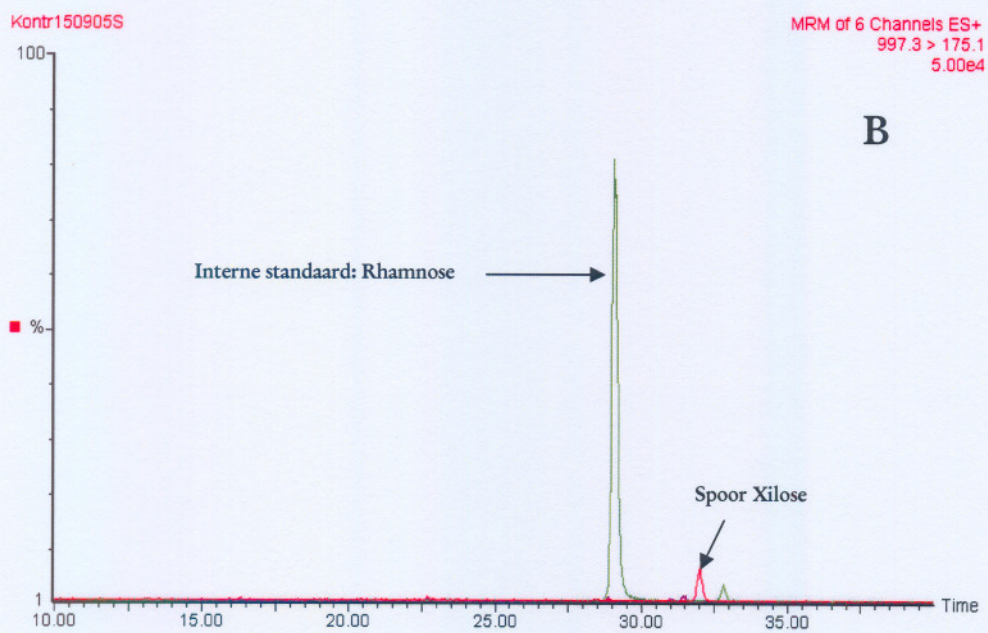
- die verhouding van disakkariede (673m/z)/monosakkariede(511m/z) is van belang om disakkaridose en wanabsorpsieprobleme te identifiseer. 'n Waarde groter as 1 dui op 'n abnormaliteit (Melichar *et al.*, 2005:337).
- Die tetrasakkaried(997m/z)/trisakkaried(835m/z) dui op 'n potensiële glikogeenstoringsdefek en moontlik lewerskade as gevolg van ernstige galaktosemie, lewersiektes of die oormatige inname van medikasie. 'n Waarde groter as 1 dui op 'n abnormaliteit (Rozaklis *et al.*, 2002:138 en Young *et al.*, 2002:175).
- Die trisakkaried(835m/z)/monosakkaried(511m/z) dui op 'n wanbalans in die bakteriese omgewing in die intestinum en is dus grootliks dieetverwant. 'n Waarde groter as 1 dui op 'n abnormaliteit.

Sommige koolhidraatdefekte, soos die lisosomale defekte, lei tot die ekskresie van vreemde oligosakkariede wat nie normaalweg in die uriene teenwoordig is nie. Die voorkoms van die merkers dui op so 'n defek ongeag wat die konsentrasie daarvan in die uriene is. 'n Ensiematiese bevestiging word aanbeveel.

Dit is van die uiterse belang om uriene van *kontrolepasiënte (met geen koolhidraatdefek)* saam met alle groepsanalises te doen. Sodoende is dit moontlik om waar te neem of enige kontaminasie geskied het en abnormale spektrums en chromatogramme kan vergelyk word met die resultate van 'n normale kontrolepasiënt. Figuur 5.3.4.1 stel die MS-MS en LC-MS-MS analise van 'n kontrolepasiënt voor. Figuur 5.3.4.12 gee die gemiddelde resultate van pasiënte met geen koolhidraatdefekte weer.



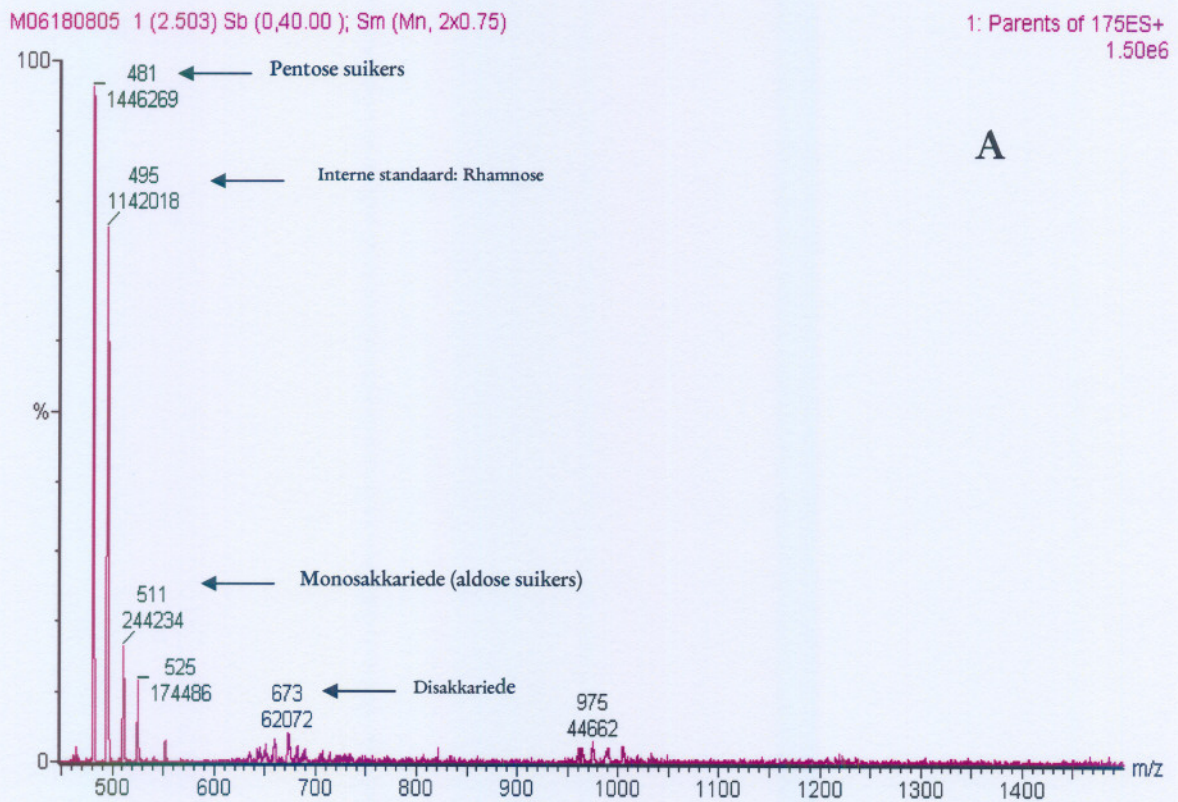
A

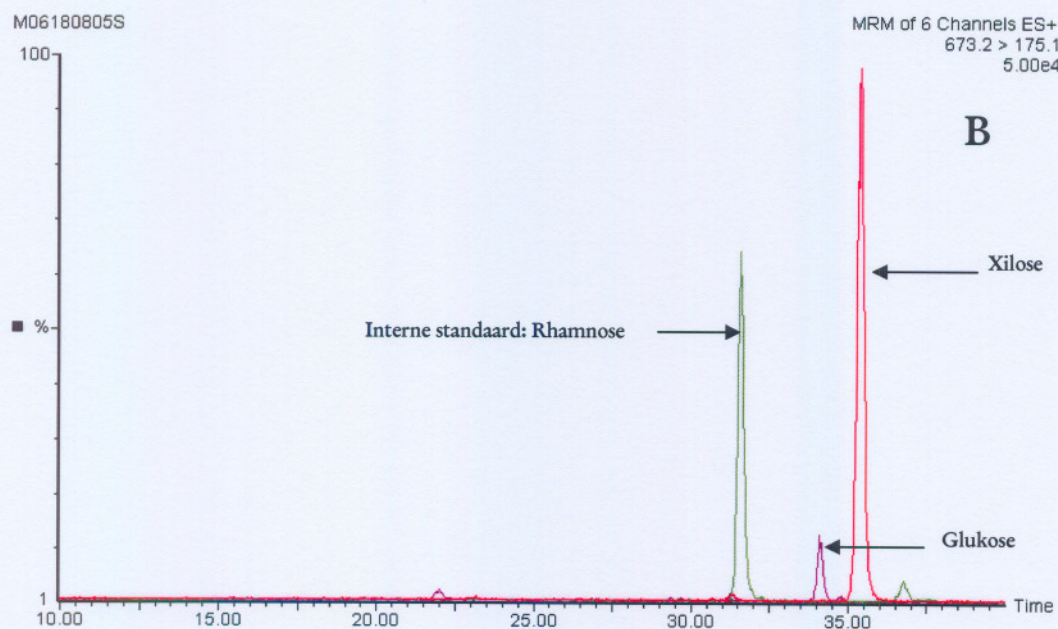


B

Figuur 5.3.4.1: Controlepatiënt – geen koolhidraatafwyking is bevestig. A) MS-MS skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding

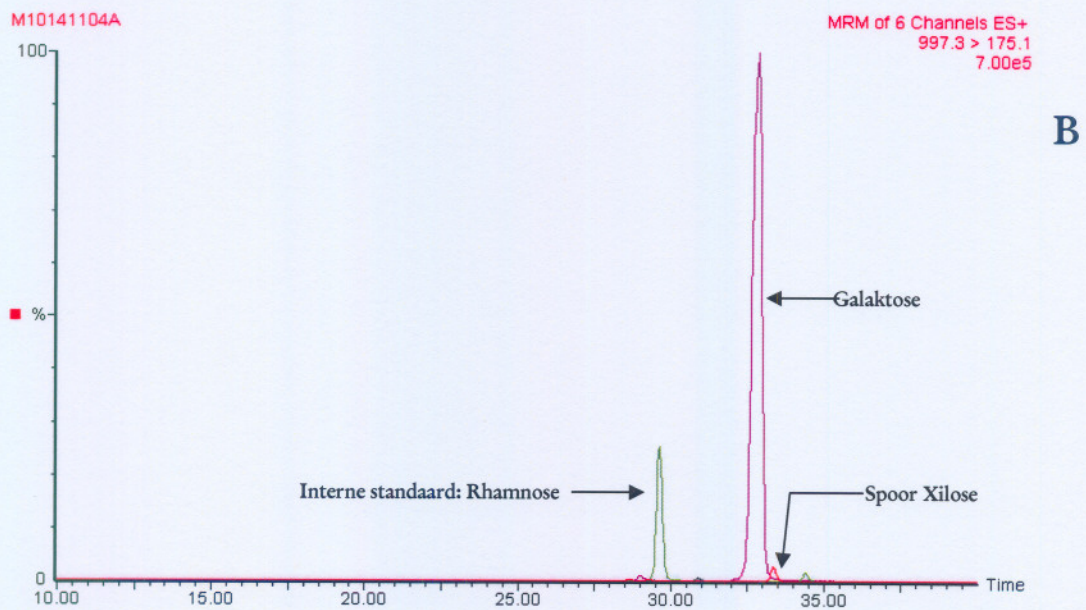
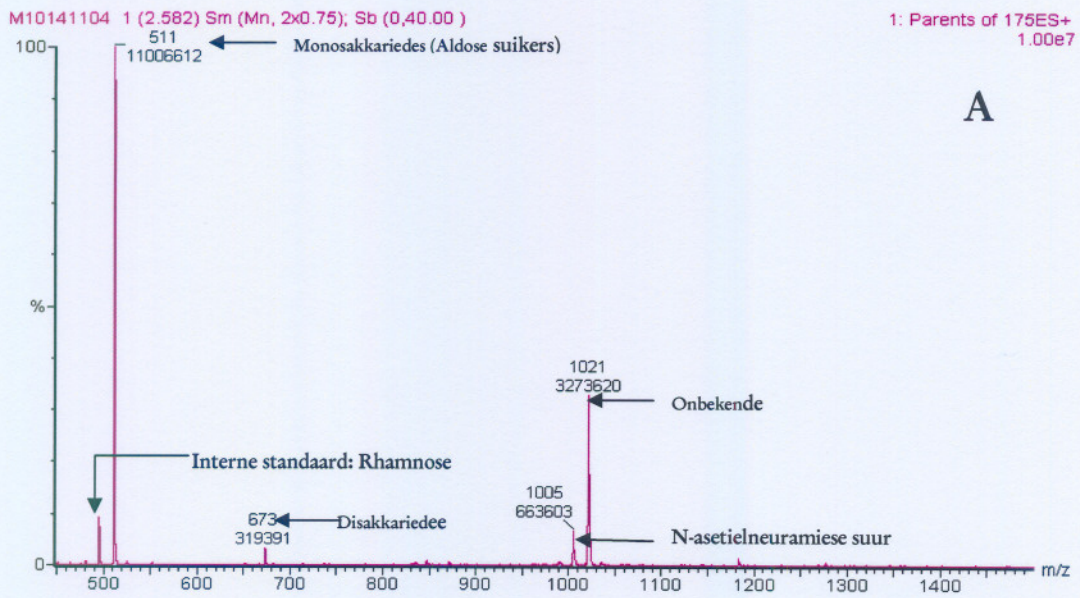
Pentosurie gaan gepaard met die uitskeiding van pentose suiker in die uriene. Die pasiënte lei gewoonlik aan 'n oorerflike pentosurie of aan 'n voedingsverwante pentosurie (Haitte, 1995:1001). Laasgenoemde is 'n defek wat moontlik by die onderstaande pasiënt geïdentifiseer is. 'n Duidelike verhoogde 481 m/z pseudo-molekulêre ioon is waarneembaar, wat die pentose suikers voorstel. Die MS-MS-Skandering dui ook 'n verhoogde pentose/IS verhouding aan en die LC-MS-MS analise bevestig die teenwoordigheid van xilose in die uriene van die pasiënt (Sien Figuur 5.3.4.2).





Figuur 5.3.4.2: Pentosurie koolhidraat-profiel. A) Tandem-MS skandering; B) Bevestigende LC-MS-MS analise.

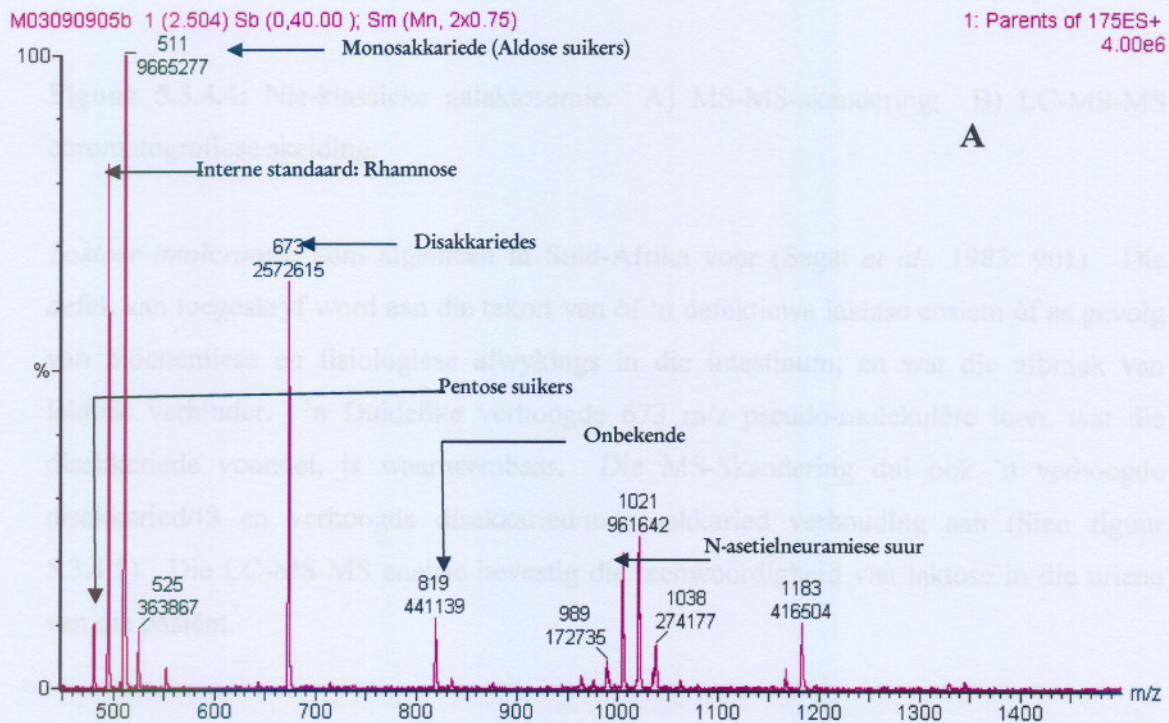
'n *Klassieke galaktosemie* resulteer in die oormaat uitskeiding van galaktose as gevolg van 'n defektiewe galaktosemetabolisme. Die ensiem wat normaalweg betrokke is by so 'n defek, is uridieltransferase. 'n Duidelike verhoogde 511 m/z pseudo-molekulêre ion is waarneembaar wat die monosakkariede (aldoses) voorstel. Die MS-MS-Skandering dui ook 'n verhoogde monosakkaried/IS verhouding aan en die LC-MS-MS analise bevestig die teenwoordigheid van glukose in die uriene van die pasiënt (Sien Figuur 5.3.4.3).

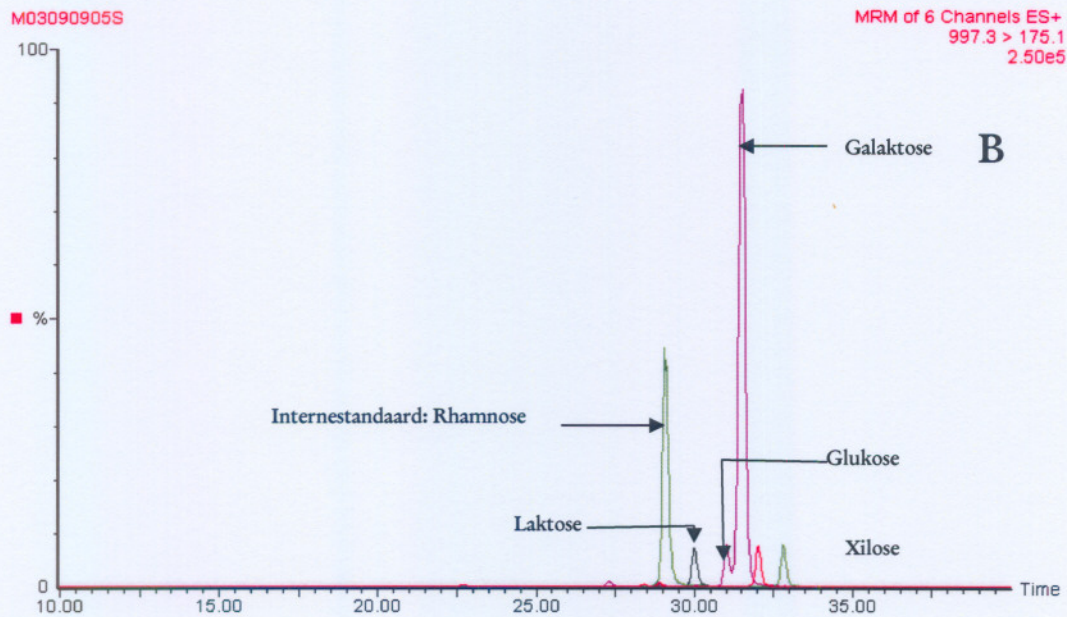


Figuur 5.3.4.3: Klassieke galaktosemie: A) MS-MS skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding.

Nie-klassieke galaktosemie pasiënte toon 'n gemengde metaboliese profiel wat dui op lewerskade sowel as verhoogde galaktosevlakke. Die galaktosevlakke is egter nie so hoog soos 'n klassieke galaktosemie nie. Die resultate van die profiel kan hoofsaaklik toegeskryf word aan 'n moontlike epimerasedefek of selfs 'n galaktokinasedefek. Daar is wel ander hipoteses wat aandui dat die profiel toegekryf kan word aan ernstige lewerskade of 'n tekort aan UDP-glukose (as gevolg van defektiewe galaktosemetabolisme) wat die afbraak van glikogeen verhoed en sodoende in lewerskade resulteer (Segal *et al.*, 2006:92).

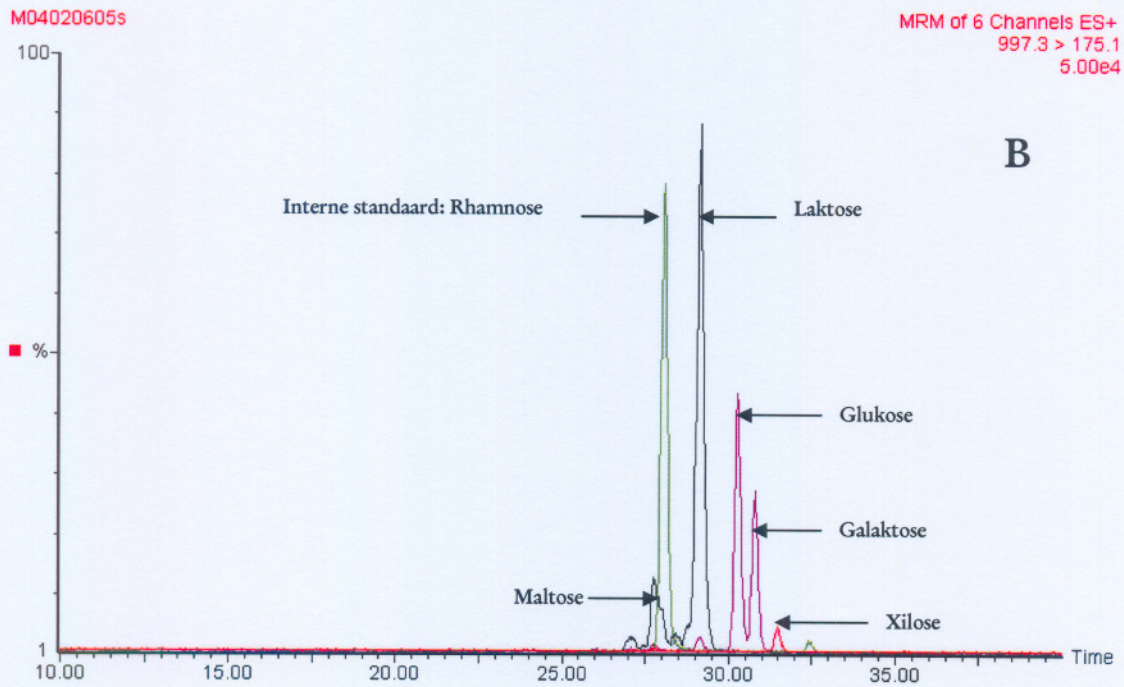
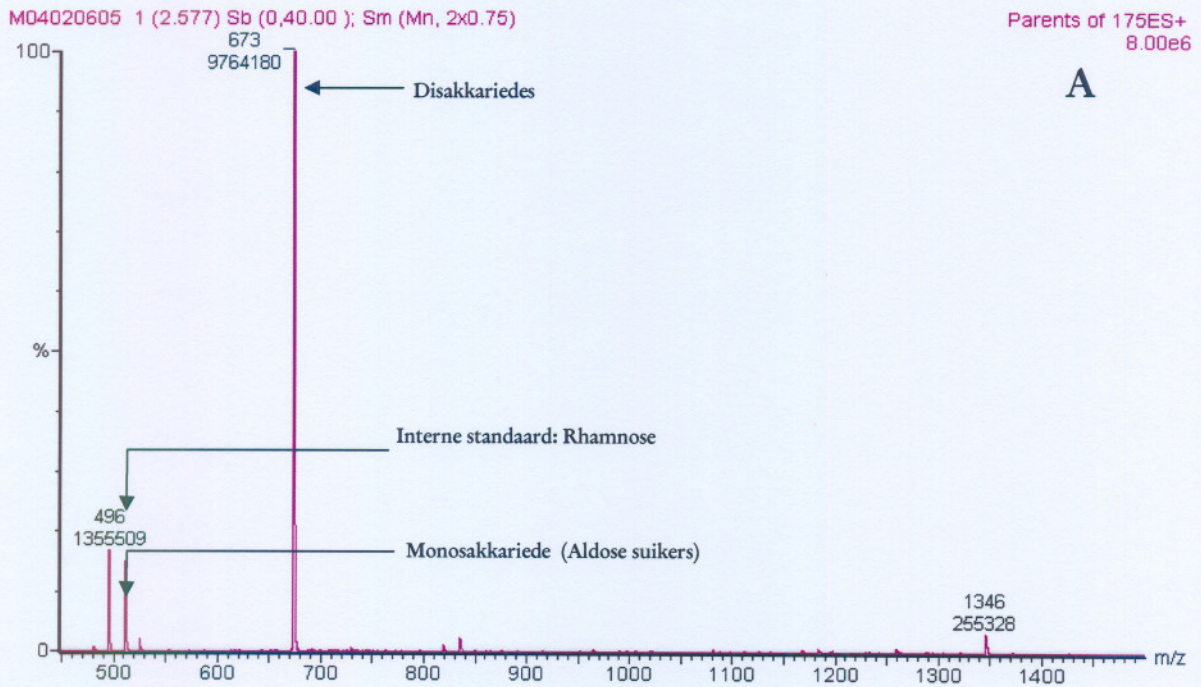
'n Duidelike verhoogde 511 m/z pseudo-molekulêre ioon wat die monosakkariede (aldoses) voorstel, is waarneembaar. Die MS-skandering dui ook 'n verhoogde monosakkaried/IS verhouding aan en die LC-MS-MS analise bevestig die teenwoordigheid van galaktose in die uriene van die pasiënt. Die voorkoms van ander koolhidrate soos glukose, laktose en xilose wys op 'n algehele abnormale koolhidraatbeeld wat lewerbetrokkenheid aandui (Sien Figuur 5.3.4.4).





Figuur 5.3.4.4: Nie-klassieke galaktosemie. A) MS-MS-skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding.

Laktose-intoleransie kom algemeen in Suid-Afrika voor (Segal *et al.*, 1983: 901). Die defek kan toegeskryf word aan die tekort van of 'n defektiewe laktase ensiem of as gevolg van biochemiese en fisiologiese afwykings in die intestinum, en wat die afbraak van laktose verhinder. 'n Duidelike verhoogde 673 m/z pseudo-molekulêre ioon, wat die disakkariede voorstel, is waarneembaar. Die MS-Skandering dui ook 'n verhoogde disakkaried/IS en verhoogde disakkaried/monosakkaried verhouding aan (Sien figuur 5.3.4.5). Die LC-MS-MS analise bevestig die teenwoordigheid van laktose in die uriene van die pasiënt.



Figuur 5.3.4.5: Laktose intoleransie: A) MS-MS skandering; B) LC-MS-MS chromatografiese skeiding.

Oligosakkaridose is 'n groep siektes wat moeilik identifiseerbaar is. Dunlaagchromatografie resultate (Figuur 5.2.1.1.4) gee geen definitiewe uitsluiting van 'n spesifieke defek nie. Die tandem-massaspektrometriese analise lewer wel belowende resultate. Verskeie reekse oligosakkaridose soos glikogeenstoringsdefekte met lewerbetrokkenheid en die N-glikaandegradasie defekte is opspoorbaar met dié analise. Probleme word egter nog ondervind met die deteksie van oligosakkariede wat sulfate (mukopolisakkariede) as funksionele groepe bevat. Die probleem mag in die toekoms oorkom word deur die tandem-MS analise in die negatiewe ioonkonformasie te gebruik.

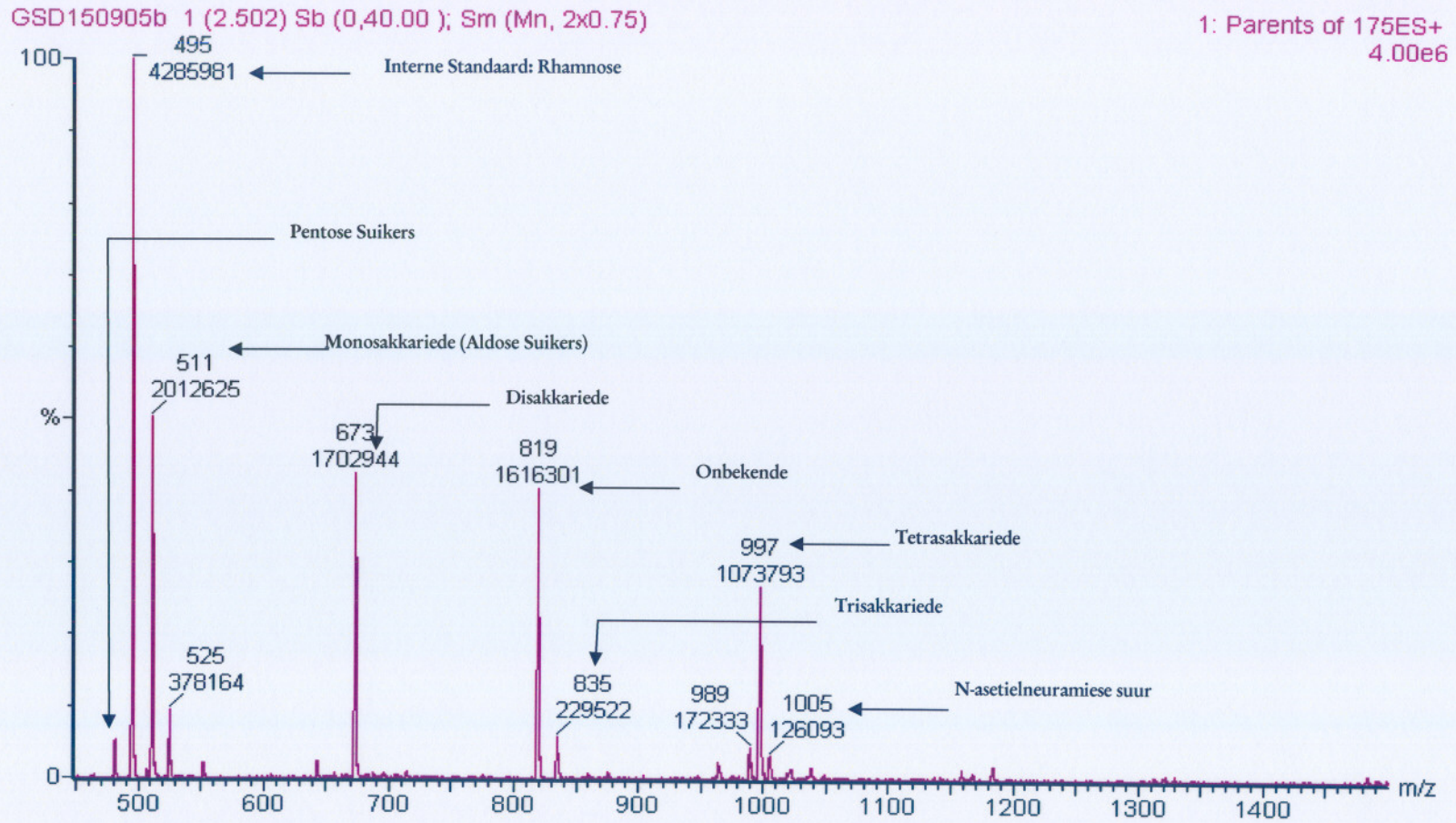
Die tegniek is voordelig aangesien slegs 'n MS-skandering van belang is en geen LC-MS-MS analise noodsaaklik is nie (mono- en disakkariedabnormaliteite kom min by oligosakkaridose gevalle voor). Die eerste groep siektes wat in die verband van belang is, is die *glikogeenstoringsiektes*. Hierdie siektes veroorsaak algehele lewerskade omdat glikogeensintese en -degradasie wat primêr in die lewer geskied. Ensiematiese bevestiging kan slegs met behulp van 'n lewerbiopsie geskied en is dus baie traumaties vir die betrokke pasiënt. Die gebruik van die tandem-massaspektrometriese metode en ander laboratoriumtoetse wat die resultaat ondersteun, kan dus 'n lewerbiopsie regverdig. Urinêre tetrasakkariede se voorkoms sowel as die verhouding tussen die tetrasakkaried (997m/z) en trisakkaried(835m/z), is aanduidend van 'n moontlike GSD-defek. Die verhouding tussen 997m/z/835m/z moet altyd kleiner as 1 wees vir die uitsluiting van 'n GSD-defek. In figuur 5.3.4.6 geval is $997m/z/835m/z = 4.7$ - wat bevestig dat die spesifieke pasiënt wel 'n GSD-geval is. Figuur 5.3.4.6 dui die spektrum GSD tipe 3, naamlik 'n de-vertakkingsensiemdefek, aan.

Lisosomale defekte is die tweede groep siektes van belang. Die siektes is van die ernstigste metaboliese defekte wat multisistemiese abnormaliteite veroorsaak. Die defektiewe degradasie van die komplekse vertakte N-gekoppelde oligosakkariede resulteer in die urinêre uitskeiding van komplekse oligosakkariedes. Die volgende tabel gee 'n opsomming van die betrokke metaboliete in die pasiënte se urine.

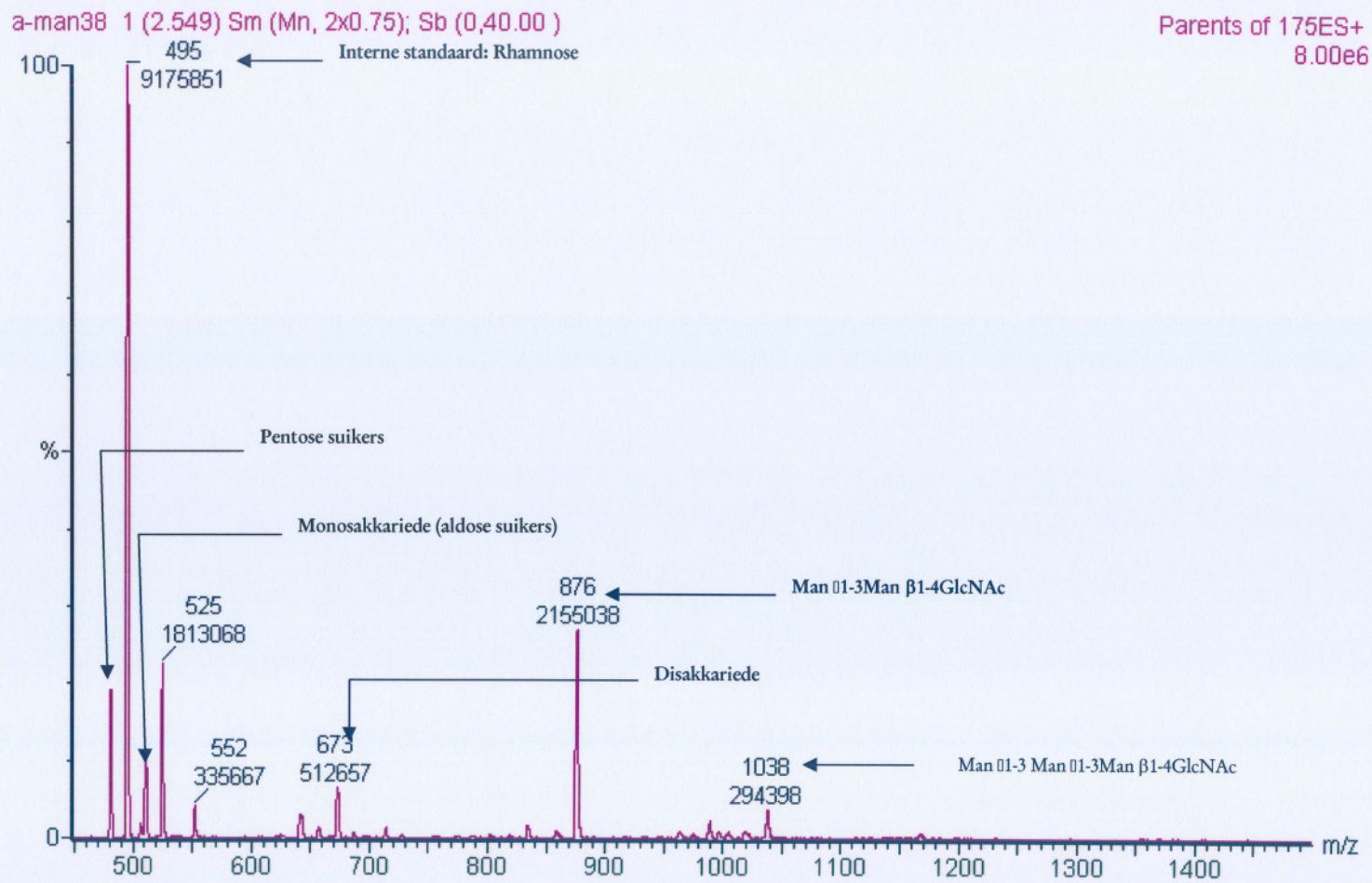
Table 5.3.4.1: Belangrike metabolietmerkers wat in die uriene van pasiënte met lisosomale storingsiektes voorkom.

Lisosomale siekte	Metaboliet	Molekulêre massa (in gram)	Pseudo-mole- kulêre ioon op die MS-spektrum
α -mannisidose (Figuur 5.3.4.7)	Man-man-GlcNAc	543	874m/z
	Man-man-man-GlcNAc	707	1038m/z
	Man-man-man-GlcNAc	869	1200m/z
β -mannosidose (Figuur 5.3.4.8)	Man-GlcNAc	383	714m/z
Gm1-gangliosidose (Figuur 5.3.4.9)	(Hex) ₃ -(GlcNAc) ₂	909	1240m/z
Fukosidose (Figuur 5.3.4.10)	Fuc-GlcNAc	358	698m/z

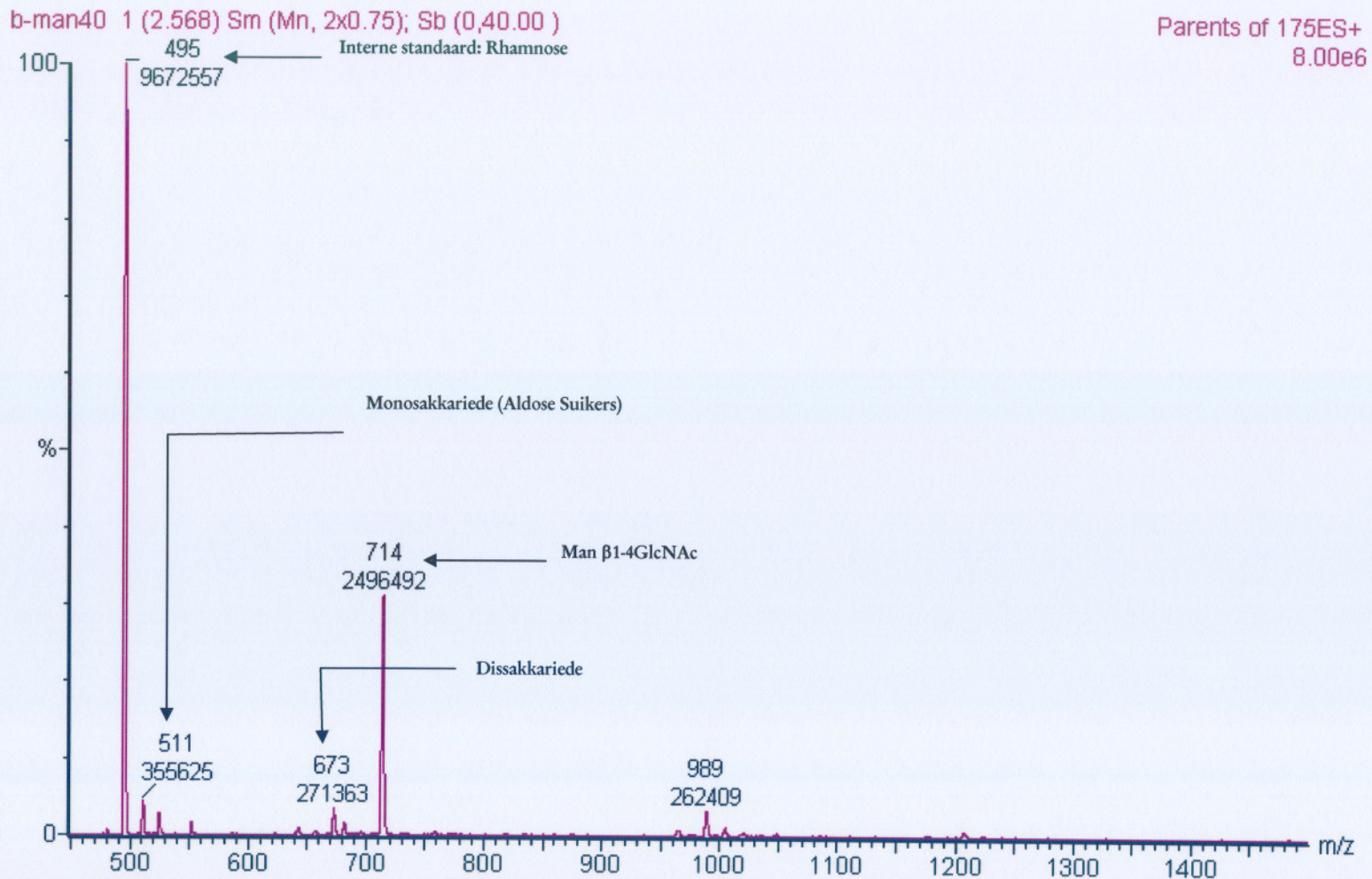
Die data wat verkry is, is bevestig deur 'n webwerf naamlik [http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/sweetdb/start.php?action =form_profiling_search](http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/sweetdb/start.php?action=form_profiling_search) (Gotz, 2005). Die webwerf is gebruik om spektra van koolhidrate (gederivatiseer en ongederivatiseer) op te los. Die identifikasie van metaboliete is met behulp van Thomas (2001:3511), Engelke *et al.* (2004:63) en Ramsay *et al.* (2004:236) bevestig. Slegs monsters van pasiënte met ensiematies bevestigde oligosakkaridose, is gebruik in die studie.



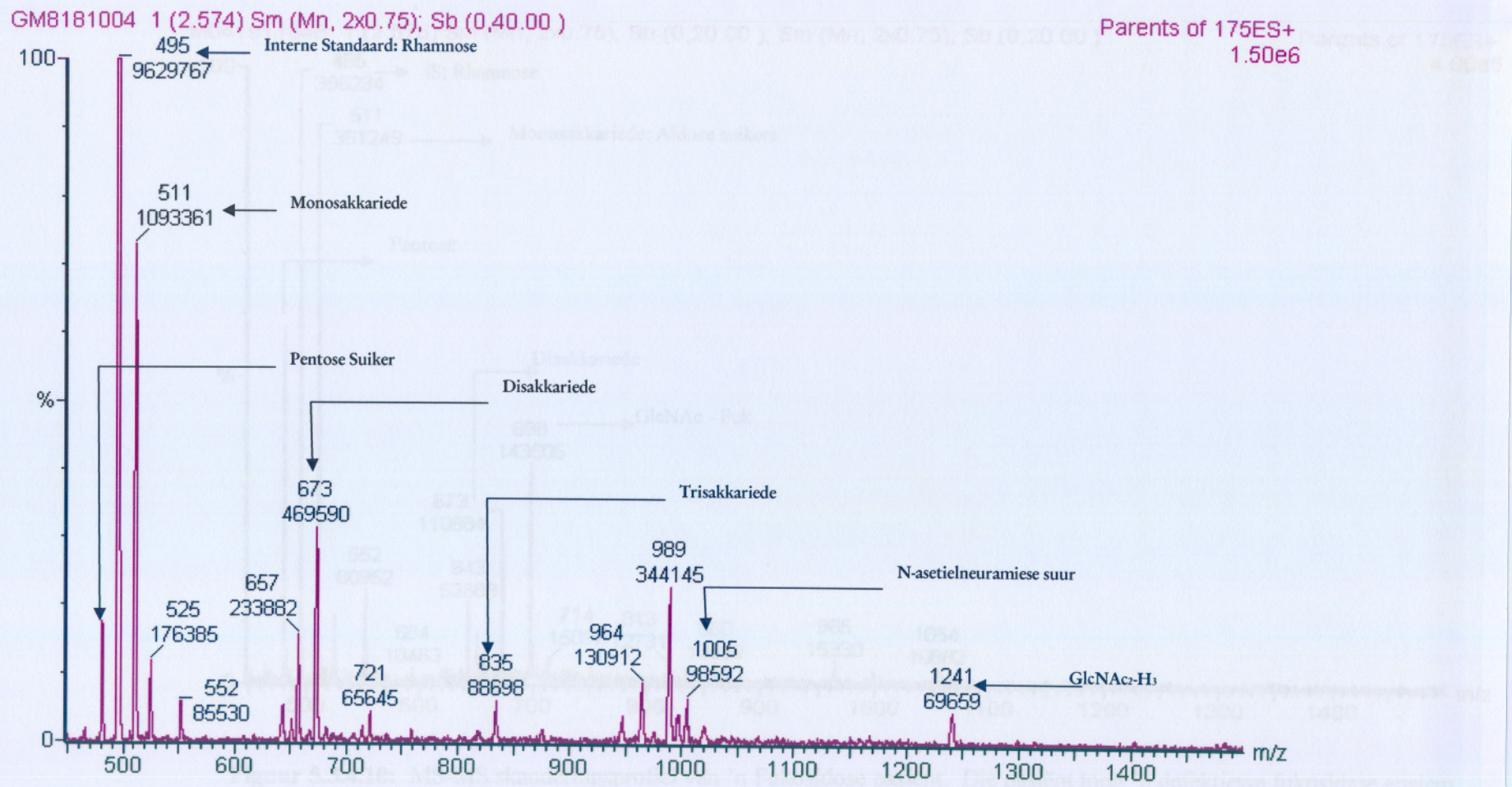
Figuur 5.3.4.6: Glikogeenstoringsiekte tipe 3 (de-vertakkingsdefek): MS-MS-skanderingsprofiel. Die teenwoordigheid van tetrasakkariede (997m/z) is duidelik waarneembaar



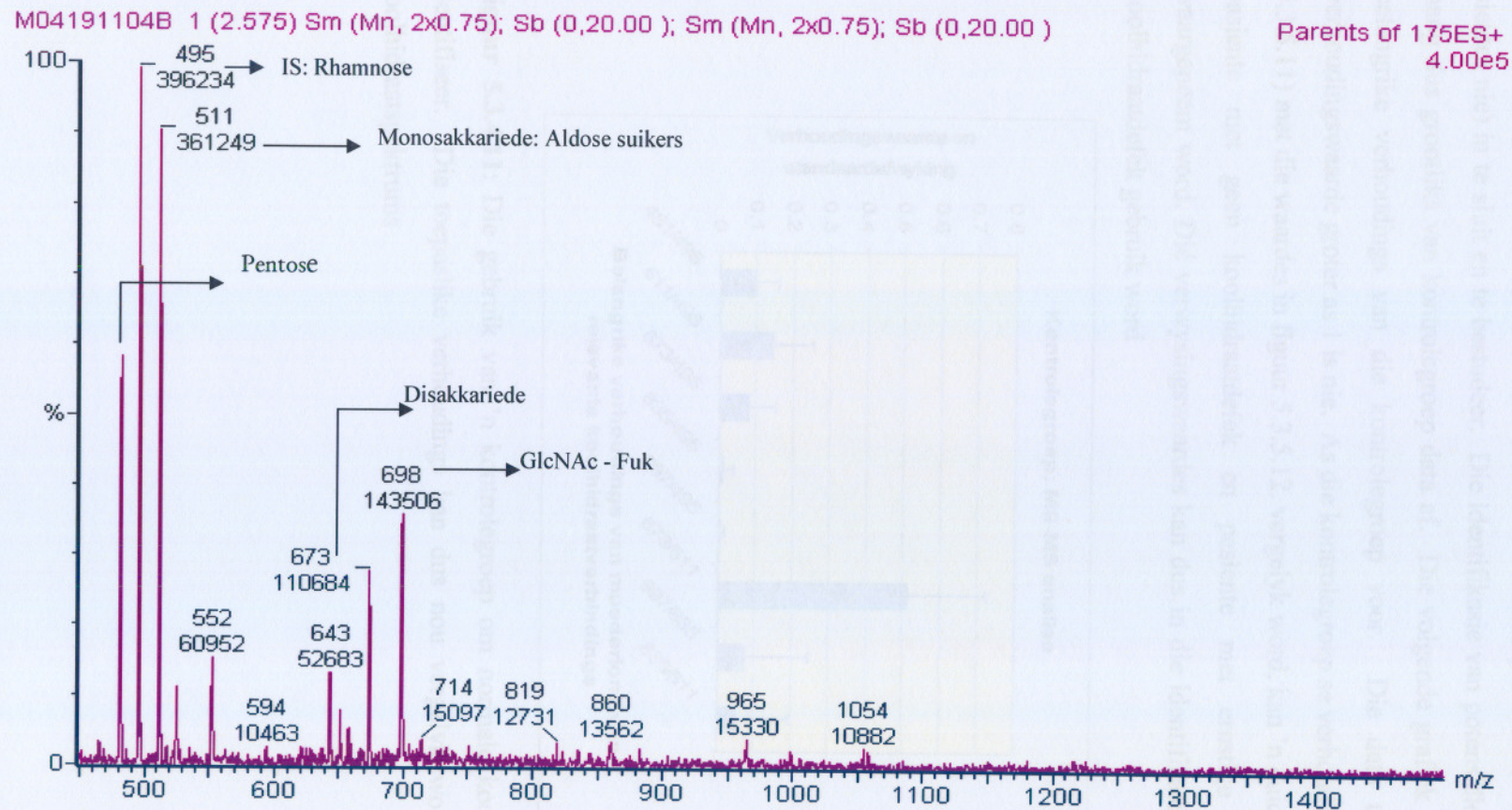
Figuur 5.3.4.7: MS-MS skanderingsprofiel van 'n α -Mannosidose pasiënt. Die pasiënt toon 'n defektiewe α -mannosidase ensiem wat resulteer in die ekskresie van mannosebevattende oligosakkariede. Die unieke 876 m/z en 1038 m/z moederione stel die urinêre metaboliete voor.



Figuur 5.3.4.8: MS-MS skanderingsprofiel van 'n β -Mannosidose pasiënt. Die pasiënt toon 'n defektiewe β -mannosidase ensiem wat resulteer in die ekskresie van mannosebevattende oligosakkariede. Die unieke 714 m/z pseudo-molekulêre ioon stel die urinêre metaboliëte voor.

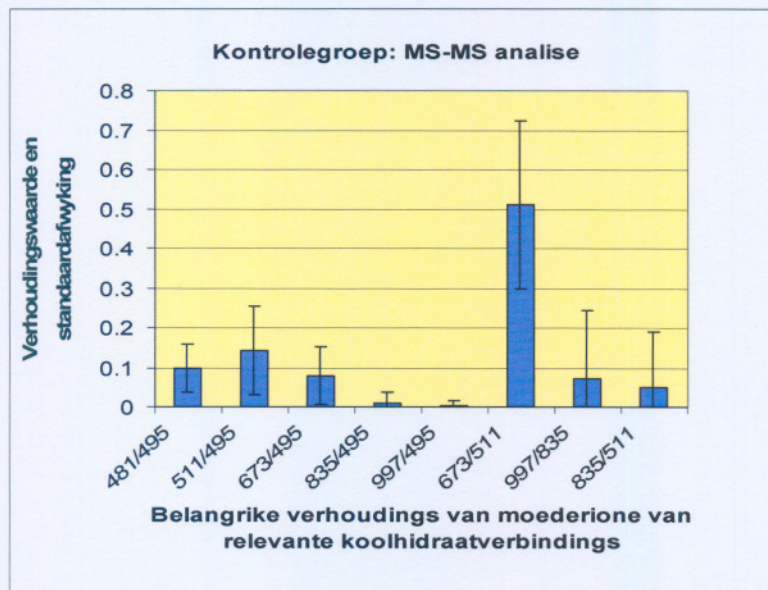


Figuur 5.3.4.9: GM₁-gangliosidose: MS-MS-skanderingsprofiel (GlcNAc = N-asetielglukosamien en H = mannose/glukose/galaktose). Die pasiënt het 'n defektiewe β-galaktosidase ensiem wat resulteer in die ekskresie van komplekse oligosakkariede

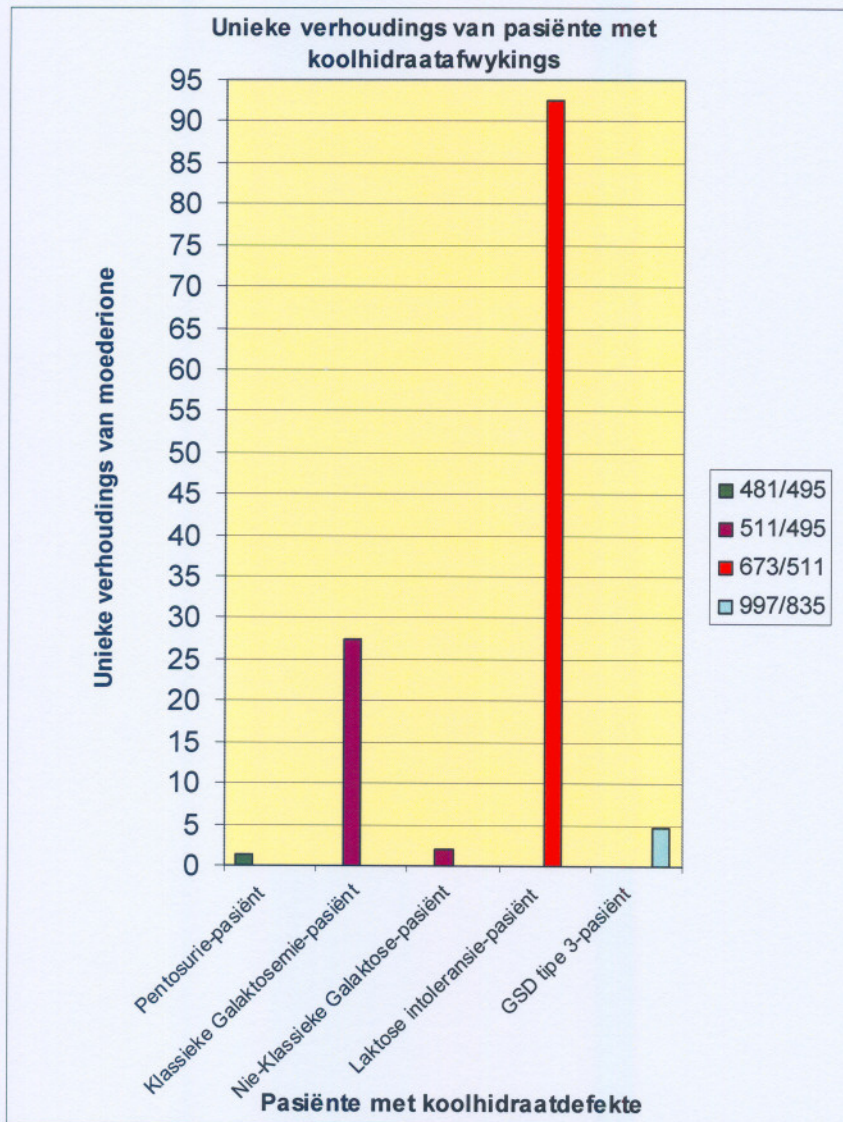


Figuur 5.3.4.10: MS-MS skanderingsprofiel van 'n Fukosidose pasiënt. Die pasiënt toon 'n defektiewe fukosidase ensiem, wat resulteer in die ekskresie van fukosebevattende oligosakkariede. Die unieke 698 m/z pseudo-molekulêre ioon stel die urinêre metabool voor.

In elke studie van biochemiese abnormaliteite wat handel oor metaboliese siektes, is dit van groot belang om soveel as moontlik normale kontrolepasiënte (met geen metaboliese siektes nie) in te sluit en te bestudeer. Die identifikasie van potensiële koolhidraatdefekte hang dus grootliks van kontrolegroep data af. Die volgende grafiek stel die biochemies belangrike verhoudings van die kontrolegroep voor. Die data toon aan dat geen verhoudingswaarde groter as 1 is nie. As die kontrolegroep se verhoudingswaardes (Figuur 5.3.5.11) met die waardes in figuur 5.3.5.12. vergelyk word, kan 'n duidelike verskil tussen pasiente met geen koolhidraatdefek en pasiente met ernstige koolhidraatdefekte waargeneem word. Dié verwysingswaardes kan dus in die identifikasie van 'n potensiële koolhidraatdefek gebruik word



Figuur 5.3.4.11: Die gebruik van 'n kontrolegroep om normale koolhidraatprofiel te identifiseer. Die toepaslike verhoudings kan dus nou vergelyk word met abnormale koolhidraatspektrums



Figuur 5.3.4.12: Grafiese voorstelling van die relevante moederioon (pseudo-molekulêre ioon) verhoudings wat by koolhidraatdefekte voorkom..

5.4 Spektrofotometriese analise van fruktose en fruktosebevattende koolhidrate (Triptamien-fruktose toets)

5.4.1 Selektiwiteit en standaardisasie van die spektrofotometriese bepaling van fruktose

Die spektrofotometriese metode word gebruik om die teenwoordigheid van fruktose, fruktosans en inulien te bepaal. Die gebruik van die spektrofotometriese metode is oorweeg as gevolg van urinêre fruktosebepalings, wat problematies voorkom. Enige koolhidraat wat fruktose as een van hul monomere bevat, sal positief toets gedurende bostaande analitiese metode. Dit vind plaas as gevolg van gedeeltelike of volkome hidrolise van komplekse koolhidrate in die ekstreme kondisies van die eksperiment. Hoë kreatinienwaardes beïnvloed soms die absorpsiewaarde. Verder is pentosesuikers, heksoses (disakkariede en monosakkariede) en suikerfosfate indirek gemonitor. Tabel 5.4.1.1 toon suikers wat positiewe resultate met bostaande metode gelewer.

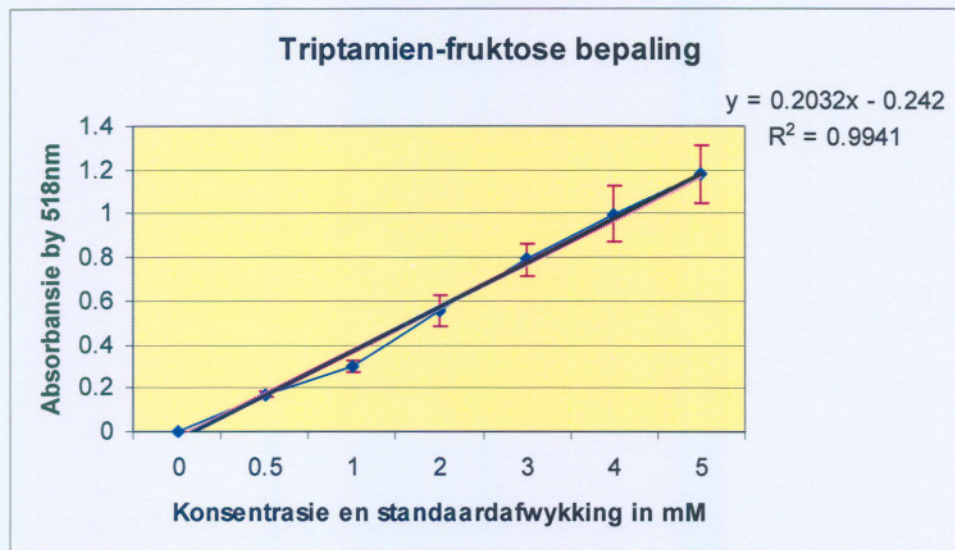
Tabel 5.4.1.1: Die triptamien-fruktose bepaling op 'n reeks koolhidrate en koolhidraatfosfate

Suiker	Absorbansie by 518nm	Positief (pers kleur)/ Negatief (kleurloos)
Fruktose 1mM	0,31±0.01	Positief
Sukrose 1mM	0,22±0.015	Positief
Glukose 1mM	0,002±0.001	Negatief

Galaktose 1mM	0.001±0.001	Negatief
Laktose 1mM	0.003±0.001	Negatief
Ribose 1mM	-0,0015	Negatief
Xilose 1mM	0	Negatief
Fruktose-1-P 1mM	0.143±0.01	Positief
Fruktose 6-P 1mM	0.204±0.009	Positief
Fruktose 1,6, biP	0.201±0.008	Positief (min pers)

Die metode is semi-kwantitatief. Dit wil voorkom asof die spektrofotometriese metode matig tot hoog-spesifiek is vir fruktose en fruktosebevattende verbindings soos aangetoon in tabel 5.4.1.1.

Die standaardisasie van die metode is gedoen deur van ses bekende fruktosekonsentrasies gebruik te maak. Die eksperimentele absorpsiewaarde vir elke konsentrasie is ses keer verkry en 'n gemiddelde standaardkromme is bepaal. Die r^2 -waarde 0.9941 (teoretiese waarde van $r^2 = 1$ onder ideale omstandighede) en die standaardfout is 0.0382. Die standaardafwyking van elke datapunt word in figuur 5.4.1.1 gegee. Die herhaalbaarheid en akkuraatheid van die triptamien-fruktose bepaling word dus eksperimenteel aanvaar.



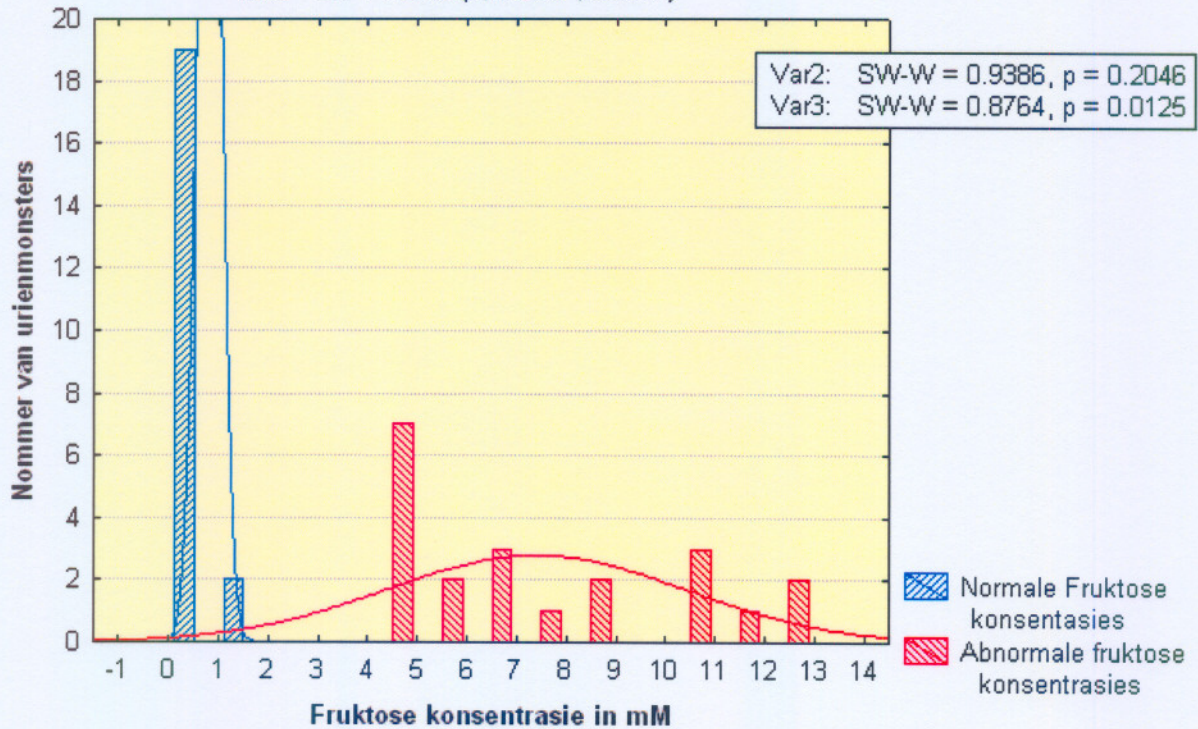
Figuur 5.4.1.1: Standaardisering van die triptamien-fruktose bepaling

5.4.2 Die bepaling van 'n gemiddelde fruktosekonsentrasie in kontrolepasiënte.

Met behulp van die standaardkromme is die fruktosekonsentrasie in urienmonsters bepaal. Tot op hede is geen standaardreferensiewaarde vir urinêre fruktose beskikbaar nie. Derhalwe is kontrolepasiënte se uriene met geen koolhidraatdefek gebruik om normale fruktosekonsentrasies te bepaal. 'n Normaalverspreiding is verkry en vergelyk met 'n normaalverspreiding van 'n groep pasiënte met fruktose-verwante afwykings. Figuur 5.4.2.1 stel die data grafies voor.

Normaalverspreiding van normale en abnormale Fruktose konsentrasies in uriene

Var2 = 21*1*normal(x, 0.7833, 0.2231)
 Var3 = 21*1*normal(x, 7.3607, 2.9931)



Figuur 5.4.2.1: Normaalverspreiding van abnormale en normale fruktose konsentrasies. Twee groepe is in die triptamien-fruktose bepaling gebruik: Groep 1: 21 kontrolepasiënte (geen koolhidraatafwyking nie) en Groep 2: 21 pasiënte met fruktose-verwante defekte is in die triptamien-fruktose bepaling gebruik.

Die betroubaarheid van die resultate van figuur 5.4.2.1, kan in die tabel 5.4.2.1 waargeneem word. Die Shapiro-Wilk W toets word gebruik om 'n aanduiding van normaliteit te lewer.

Tabel 5.4.2.1: 'n Opsomming van die statistiese waardes van die normaalverspreiding van die twee betrokke groepe pasiënte

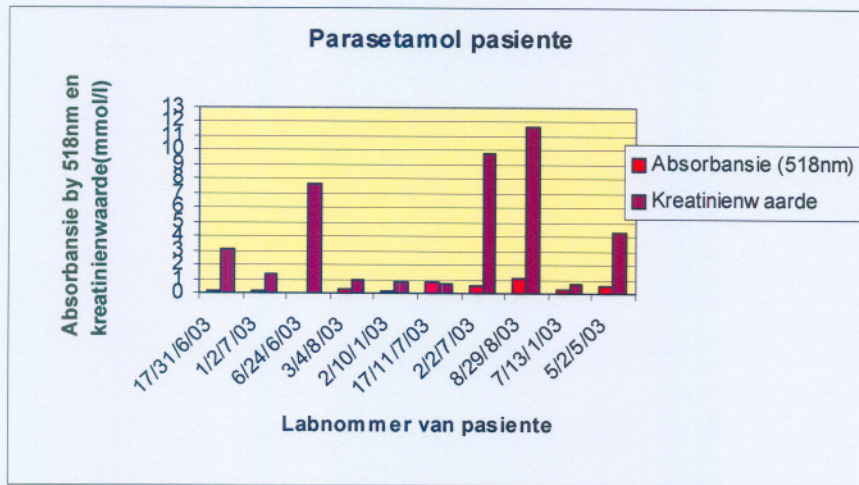
Groepe	Gemiddeld	Standaard-afwyking	Shapiro-Wilk W Toets (Normaliteit=1)	Vetrouensintervalle (gemiddeld ± stdafw)
1 (Kontrolegroep)	0.783	0.223	0.93862	0.337 tot 1.229
2 (Fruktose-erwante afwykings)	7.360	2.99	0.8764	1.38 tot 10.35

Die t-toets word gebruik om die gemiddeld van die twee betrokke groepe te vergelyk. 'n Lae p-waarde (< 0.05) vir die t-toets beteken dat die gemiddeld van die twee groepe betekenisvol verskil en dus aanvaarbaar is. In die geval van die bostande groepe is $p=0$ en word derhalwe aanvaar (alle dataverwerking is met behulp van Statistica 7.0 gedoen).

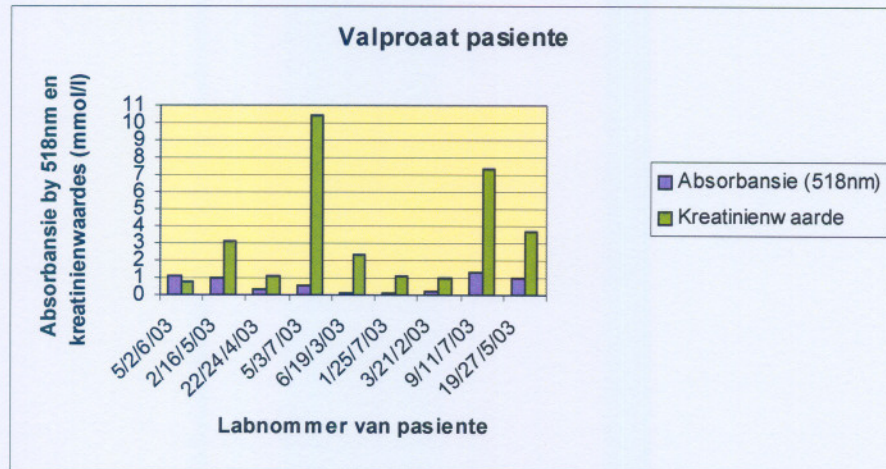
Die normaalwaardes vir fruktose in die bloed is 0.16 mmol/l (Duran *et al.*, 1996:289). Geen urinêre fruktose normaalwaardes is in die literatuur beskikbaar nie. Dit was dus nodig om 'n kontrolegroep, met normale koolhidraatprofiel, te gebruik om die gemiddelde fruktosewaarde in urienmonsters te bepaal. Die eksperimentele normaalwaardes vir 'n Suid-Afrikaanse populasie kan dus aanvaar word as kleiner as 1mM in 100 μ l uriene.

5.4.3. Die invloed van medikasie op die spektrofotometriese bepaling van fruktose

Urienmonsters van pasiënte wat Valproaat en Parasetamol ingeneem het, is in dié deel van die studie gebruik. Die afbraakprodukte van die medikasie word in die uriene uitgeskei en mag dus 'n invloed hê op die spektrofotometriese bepaling van fruktose in uriene. Dit is bevestig met behulp van kliniese inligting van die pasiënte sowel as organiesesuur analyses op die betrokke urienmonsters. Ander medikasie-metaboliete is egter nie in ag geneem nie. Die volgende grafieke stel die absorbansie sowel as die kreatinienwaardes van die geselekteerde groep, wat onderskeidelik Parasetamol en Valproaat ingeneem het, voor.



Figuur 5.4.3.1: Die invloed van Parasetamolmetaboliete op die spektrofotometriese bepaling van urinêre fruktose. Die invloed van die kreatinienwaarde word grafies voorgestel.



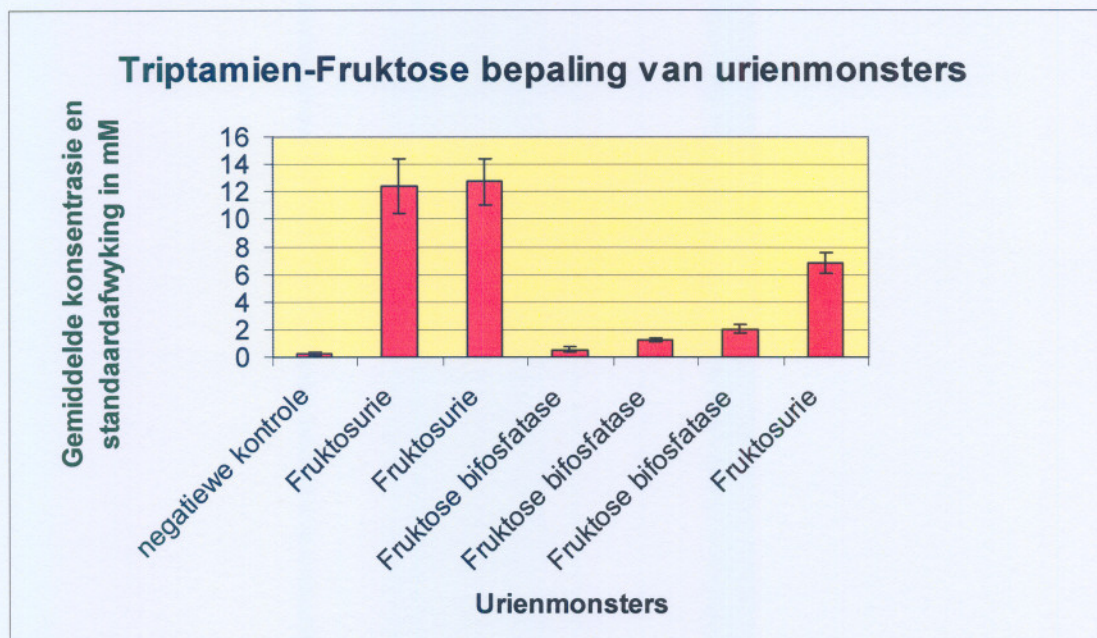
Figuur 5.4.3.2: Die invloed van Valproaat op die spektrofotometriese bepaling van urinêre fruktose. Die invloed van die kreatinienwaarde word grafies voorgestel.

Uit figuur 5.4.3.2 wil dit voorkom asof Valproaat tog 'n invloed het op die bepaling van urinêre fruktosekonsentrasies. Parasetamol se invloed is aansienlik minder. Dit is dus belangrik om kennis te neem van die pasiënt se inname van Valproaat en Parasetamol voordat die analise uitgevoer en 'n diagnose gemaak word. Op so 'n wyse kan vals positiewe diagnose tot die minimum beperk word.

Die toets kan dus gebruik word om onderskeid te tref tussen Parasetamol en fruktose wat op dieselfde posisie op die dunlaagchromatogram voorkom. Die toets is gevolglik 'n gepaste siftingstoets vir urinêre fruktose, maar ensiematiese bevestiging moet gedoen word as die resultaat wel positief is.

5.4.4 Urinêre fruktosebepaling van pasiënte met 'n definitiewe fruktose metaboliese defek.

'n Spektrofotometriese bepaling en standaardkromme in figuur 5.4.1.1 is gebruik om die fruktosekonsentrasies in uriene van pasiënte, met bevestigde defekte in die kataboliese weg van fruktose, te bepaal. Die defekte is ensiematies bevestig. 'n Defektiewe adolase B defek resulteer in verhoogde urinêre fruktose en fruktose-1,6 bifosfatase defek resulteer in die akkumulاسie van fruktose-1-fosfaat in die bloed en soms verhoogde fruktosevlakke in die uriene. Die bepaling van monsters se fruktosevlakke is ses keer herhaal om die standaardafwyking op die konsentrasies te bepaal en sodoende die akkuraatheid van die metode te bereken (Figuur 5.4.4.1).



Figuur 5.4.4.1: Grafiese voorstelling van die gemiddelde fruktosekonsentrasie \pm S.D. van pasiënte met bevestigde defekte in die fruktosekatabolisme.

In die geval van fruktosurie defekte (wat gewoonlik geassosieer word met 'n aldolase B defek) gee die fruktosebepaling 'n duidelike positiewe resultaat. Vir 'n fruktose 1,6-bifosfatase defek is dit nie oortuigend positief nie, omdat urinêre fruktose nie altyd verhoog in die urine van hierdie pasiënte voorkom nie.

Voordat 'n defek bevestig kan word, moet die kliniese beeld sowel as ander laboratoriumtoetse in ag geneem word om die korrekte diagnose te verseker. Byvoorbeeld, 'n tipiese fruktose intoleransie (aldolase B defek) sal gepaard gaan met laktiese asidose, verhoogde gliserol en hiperuriensuururie. Hierdie verbindings sal teenwoordig wees op die organiesesuurprofiel. Dit is van groot belang om die kliniese simptome saam met ander laboratoriumtoetse te gebruik om 'n moontlike defek te bevestig. Herhaalmonsters moet aangevra word en die gepaste ensiemanalise moet aanbeveel word.

5.5 Samevatting

Verskeie metodes kan gebruik word in die ondersoek na urinêre koolhidrate. Drie spesifieke metodes is in hierdie studie gebruik, omdat hulle aanvullende eienskappe tot mekaar het. Die invloed van te hoë of lae koolhidraatkonsentrasies, medikasie-metaboliete en kwalitatiewe aard van dunlaagchromatografie is oorkom deur die gebruik van tandem-massaspektrometrie en spektrofotometriese analise.

Dunlaagchromatografie is egter van belang in die aanvanklike stap van 'n siftingsprosedure vir ondersoek na koolhidraatdefekte. Die bepaling van Rf-waardes vir mono- en disakkariede sowel as unieke 'n koolhidraat-“patrone” gee 'n aanduiding van die betrokke defek wat moontlik betrokke mag wees. Die tweede stap van sifting behoort te geskied mits 'n abnormale dunlaagchromatografie resultaat verkry word. *MS-MS en LC-MS-MS* analise van PMP-koolhidraatderivate sal 'n sensitiewe en duidelike beeld kan lewer ten opsigte van die pasiënt se koolhidraatprofiel. MS-MS analises word toegepas in die identifikasie van oligosakkaridose. Die LC-MS-MS bevestig die teenwoordigheid van mono- en disakkariede. Beperkings van die LC-MS-MS analise ten op sigte van die analisering van ketosuikers bestaan wel. Die aanwending van die *spektrofotometriese metode* en triptamien derivatisering van hoofsaaklik fruktose en fruktosebevattende verbindings, is 'n aanvullende analise om urinêre ketosuikers te identifiseer.

Met behulp van die drie bogenoemde analises is 'n doeltreffende en tydseffektiewe siftingsprosedure ontwikkel vir metaboliese koolhidraatdefekte. Dit is belangrik dat ander faktore in ag geneem word tydens die siftingsprosedure. Die kliniese beeld van die pasiënt, medikasie wat die pasiënt neem, addisionele laboratoriumanalises en ander eksterne

faktore moet in ag geneem word. Die finale diagnose sal egter bevestig moet word deur ensiematiese analise of DNA identifisering.

Hoofstuk 6

Gevolgtrekking

Die literatuuroorsig wat vir die studie gedoen is, toon dat koolhidraat metaboliese defekte aan die toeneem is en dat koolhidrate 'n beduidende rol mag speel in multi-faktoriale siektes. In dié studie is 'n suksesvolle protokol geformuleer vir die effektiewe analise van koolhidrate. Die doel van die studie is bereik deur 'n doeltreffende siftingsprosedure daar te stel, om sodoende die betrokke siektes te kan identifiseer. Die voordele en nadele van die analisering van koolhidrate het duidelik in die studie na vore gekom. Dunlaagchromatografie, tandem-massaspektrometrie en spektrofotometrie is in samehang met mekaar gebruik om die tekortkominge van elke tegniek aan te vul, sowel as om die kwalitatiewe aard van koolhidraatanalisering te verbeter.

Die metodes is ook suksesvol toegepas in die identifikasie van koolhidraat metaboliese defekte wat voorheen nie moontlik was met tradisionele siftingsprosedures nie. Metaboliese defekte soos galaktosemie en laktose intoleransie kan nou met behulp van dunlaagchromatografie sowel as massaspektrometrie (LC-MS-MS skeidings) met sekerheid geïdentifiseer word. Die monitering van fruktose in pasiënte met fruktosurie en 'n defektiewe fruktose-1,6-bifosfatase defek is bewerkstellig deur gebruik te maak van 'n spektrofotometriese metode wat aanvullend is tot die dunlaagchromatografie resultaat. Die suksesvolle interpretasie van komplekse koolhidraatprofiele van pasiënte met glikogeenstoringsiektes en lisosomale storingsiektes is ook een van die vele bydraes wat deur die studie gemaak is.

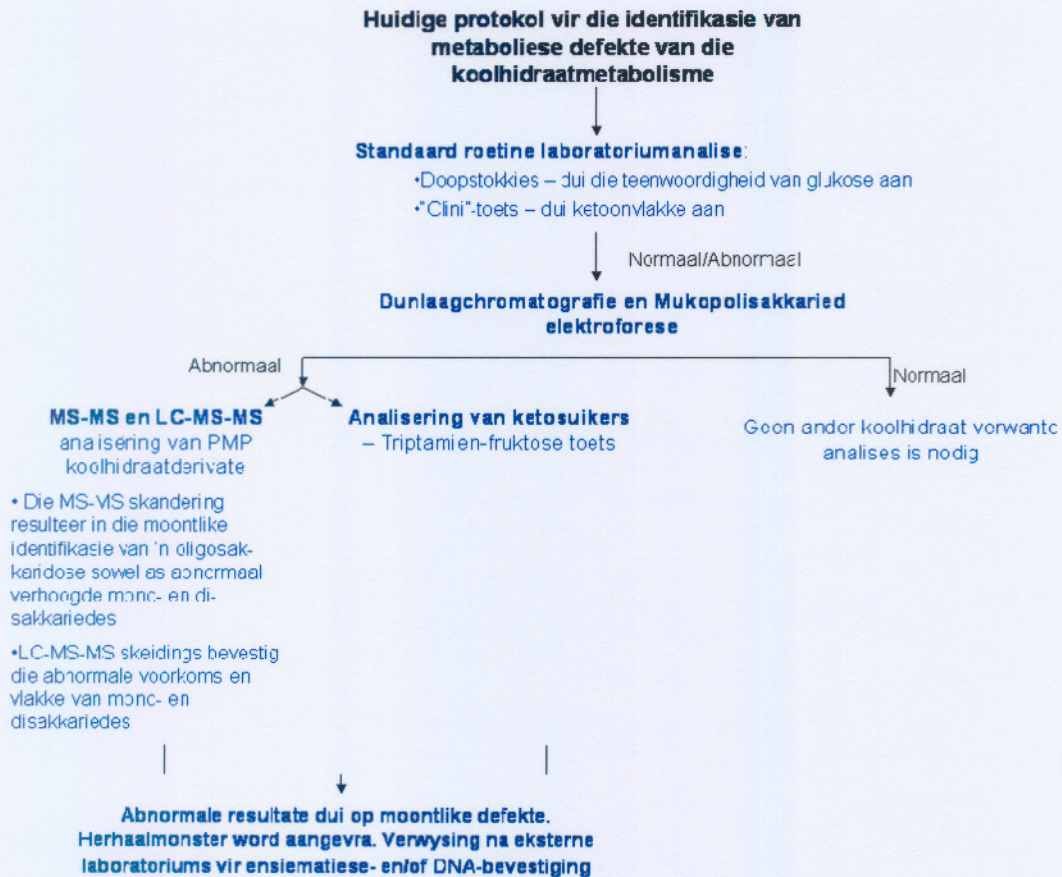
6.1 Voorgestelde areas van verbetering

Die volgende voorstelle vir verdere toepassings en verbeteringe word gemaak:

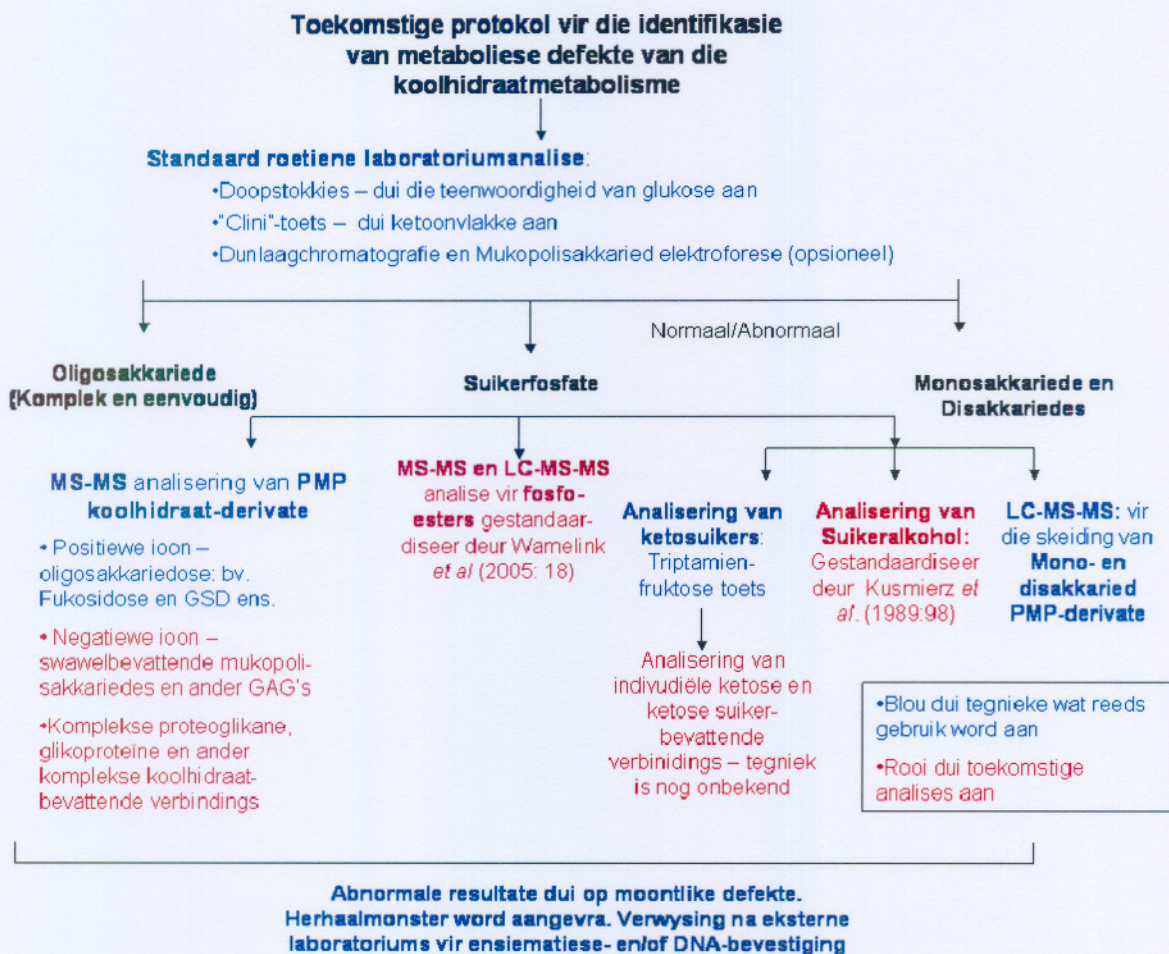
- Dunlaagchromatografie kan optimaal vir die verskillende groepe oligosakkariede, disakkariede en aminosuikers gestandaardiseer word.
- Dunlaagchromatografie analyses mag verbeter word deur 'n semi-kwantitatiewe eienskap aan die tegniek te verskaf. Dit kan gedoen word deur 'n skanderingsstelsel in plek te stel wat die analiese op die chromatogram met behulp van 'n gevorderde rekenaarprogram identifiseer en 'n relatiewe konsentrasiebepaling doen.
- Die isolasie van koolhidrate vanuit die urine monster, met behulp van 'n ontsoutingstegniek voor die uitvoering van dunlaagchromatografie, mag differensiasie tussen analiese verbeter.
- Die analisering van individuele mono- en disakkariede met behulp van LC-MS-MS moet vir roetine analyses aangepas word, aangesien dit min effektiwiteit toon ten opsigte van die tyd wat gebruik word (1 uur per analiese). Dit kan bewerkstellig word deur die moontlike gebruik van 'n alternatiewe korter kolom of vloeistofchromatogramprogram.
- Die sensitiwiteit ten opsigte van disakkariede tydens die skeidingsanaliese kan verbeter word.
- 'n Meer gevorderde analiese van individuele ketoses en ketose-bevattende suikers is nodig vir 'n meer effektiewe siftingsprosedure van koolhidrate.

6.2 Voorstelle vir toekomstige navorsing

Uit die studie is dit dus duidelik dat 'n effektiewe protokol vir die sifting van koolhidrate van groot belang is. 'n Protokol vir die siftingsprosedure vir huidige gebruik en vir toekomstige gebruik word in figuur 6.2.1 en 6.2.2 voorgestel. Die skematiese voorstelle bevat 'n samestelling van roetine analise in die hedendaagse laboratorium sowel as in die ideale laboratoriumopset.



Figuur 6.2: Skematiese voorstelling vir die siftingsprosedure wat tans in die roetinelaboratorium gebruik word.



Figuur 6.2.2: Skematiese voorstelling vir die siftingsprosedure wat in die toekoms in die roetinelaboratorium gebruik kan word.

Bronnelys

ANDERSON, D. M. red. 2002. .Mosby's medical, nursings & allied health dictionary. 6de uitgawe. United kingdom: p313, 331, 391, 450, 524, 1039,1085

ANDERSON, J.W. *et al.* 2005. Glucosamine effects in humans: a review of effects on glucose metabolism, side effects, safety considerations and efficiency. *Food and chemical toxicology*. 43: 187-207. Nov, 9

AULA, P. *et al.* 2001. Aspartylglucosaminuria. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8ste uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P3535-3550)

BLOM, W. *et al.* 1983. Thin layer chromatography of oligosaccharides in urine as rapid indication for the diagnosis of lysosomal acid maltase deficiency (Pompe's disease). *Clinical Chem Acta*. 134(1-2): 221-227. Oct, 31

BURKE, J.R. *et al.* 1996. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPHD. *Natural Medicine*. 2(6): 609-610

CHEN, Y. & BURCHELL, A. 1995. Glycogen Storage disease. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 6de uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P 935-966.)

DEMEO, T.M. *et al.* 2002. The small intestine and Nutrition: Intestinal Permeability and Gastrointestinal Disease. *Journal of clinical Gastroenterology*. 35(4): 385-396. Apr

DESNICK, S & SCHINDLER, R. 2001. α -N-acetylgalctosaminidase deficiency: Shindler disease. (In Scriver, C.R., red. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8ste uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P3483-3505)

DISCHE, Z. 1962. General Color reaction. (In Wistler, R.L. red. Methods in carbohydrate chemistry: Analysis and preparation of Sugars. 1ste uitgawe. Academic Press: New York. P 478-514.

DUBOIS, M. 1956. A colorimetric method for determination of reducing sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 28: 351-353

ENGELKE, F.H. *et al.* 2004. N-acetylated metabolites in urine: Proton nuclear, magnetic resonance spectroscopic study on patients with inborn errors of metabolism. *Clinical chemistry*. 50 (1): 58-66. Nov

FERRER, J.C. *et al.* 2003. Control of glycogen deposition. *FEBS letters*. 546: 127-132. May, 26

GARRETT, R. H., & GRISHAM, C. M. 2005: Biochemistry. Singapore: Tomson learning inc. p202-246; 578-607

GIZELMANN, R *et al.* 1995. Disorders of fructose metabolism. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 6de uitgawe. McGraw-Hill: United. P905-934)

GOPAUL, K.P. & CROOK, M.A. 2006. Salic acid: A novel marker of cardiovascular disease? *Clinical biochemistry*. 3: 1-15. Feb, 22.

GÖTZ, T. 2005. German Cancer research center Heidelberg, Central spectroscopic division, Heidelberg, Germany. [web:] http://www.dkfz-heidelberg.de/spec/sweetdb/start.php?action=form_profiling_search [Date of Access: 14 jan 2006]

GRIFFETH, W. J. *et al.* 2001. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochemistry Journal*, 355: 545-561. Jan

GUTHRIE, R.D. 1962. Periodate Oxidation. (*In* Wistler, R.L. *red.* Methods in carbohydrate chemistry: Analysis and preparation of Sugars. 1st uitgawe. Academic Press: New York. P 432-447

HARDY, D.T. 1999. Technological developments: development of tandem-mass spectrometry for neonatal screening. Micromass developers: Birmingham. P 1-81

HAUPT, D.W. & NEWCOMER, J.W. 2002. Abnormalities in glucose regulation associated with mental illness and treatment. *Journal of psychosomatic research*. 53: 925. Jan

HEITMEIER, S & BLASCHKE, G. 1999. Direct determination of Paracetamol and its metabolites in the urine and serum by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Journal of chromatography B*. 721: 93-108. Aug, 31

HENDERSON, H. *et al.* 2002. The clinical and molecular spectrum of galactosemia in patients from the Cape town region of South Africa. *BMC Pediatrics*. 2(7):1-6.Sep, 2

HIATT, H.H. 1995 Pentosuria. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 6de uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P 1001-1012)

HODGSON, E & LEVI, P.E. 1994. Introduction to biochemical toxicology. 2de uitgawe. Appleton & Lange: Norwalk. P113-119

HOLANDER, D. 1992. The intestinal permeability barrier: a hypothesis as to its regulation and involvement in Chrones's disease. *Scandanavian Journal of gastroenterology*. 27(9): 721-726. Sep

HOMMES, F.A. 1991. Determination of bound and free sialic acid in urine. (*In* Hommes, F.A, *red.* Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual. Wiley-Liss,Inc: United States of America. P 234-237)

HONDA, S. *et al.* 2003. Analysis of carbohydrates as 1-phenyl-3methyl-5pyrazolone derivatives by capillary/microchip electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30: 1689-1714. Aug

HOPFER, U. 2002. Textbook of biochemistry with clinical correlation. 5de uitgawe. Ed: Devlin, T.M. Wisley-Liss: New York. P1100-1105

KENNEDY, J.F. & WHITE, C.A. 1983. Bioactive carbohydrates. 1ste uitgawe. Ellis Horwood limited: Chichester. 15-45

KANEHISA LABORATORIES. 2005. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. [Web:] <http://www.genome.jp/kegg/>. [Date of access: 2 Feb 2006]

KUSMIERZ, J. *et al.* 1989. Quantitative analysis of polyols in human plasma and cerebrospinal fluid. *Journal of chromatography: Biomedical applications*. 497: 39-48. Aug, 8.

LAMARI, F. N. *et al.* 2003. Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *Journal of chromatography B*. 793(1):15-36-21. Aug

LEVITT, N.S. 1996. Diabetes mellitus in Black South Africans. *International journal of diabetes division*. 16: 41-44

LINDHORST, T.K. 2000. Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry. Wiley-VCH: Weinheim. P 2-193

MARTINOV, M.V. *et al.* 2000. Deficiency of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochimia et Biophysica Acta*. 1474: 75-87. Des, 6

MAZZIO, E & SOLIMAN, K.F.A. 2003. The role of glycolysis and gluconeogenesis in the cytoprotection of neuroblastoma cells against 1-methyl 4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neurotoxicology*. 24: 137-147. Jul, 02

McKUSICK, V.A. 2005. OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man. [Web:] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>. [Date of access: 7 Feb 06]

McLAUGHLIN, D.B *et al.* 2000. Valproate metabolism during valproate-associated hepatotoxicity in a surviving adult patient. *Epilepsy research*. 41: 259-269. Mar, 31

McMURRY, J. 1996. Organic chemistry. 4de uitgawe. Brooks/Cole Publishing Company: Washington. P 1010-1048.

MELICHAR, B *et al.* 2005. Intestinal Permeability in the Assessment of Intestinal Toxicity of Cytotoxic Agents. *Chemotherapy*. 51:336-338. Okt, 15

MILLER, A.L. 1997. The Pathogenesis, Clinical Implications and Treatment of Intestinal Hyperpermeability. [Web:] <http://www.thorne.com/altmedrev/fulltext/intestine2-5.html>. [Date of access: 10 Sep 02]

MOSS, G.P. 1996. International union of pure and applied chemistry and international union of biochemistry and molecular biology. Nomenclature of carbohydrates. [Web:] . [Date of access: 8 Feb 2005]

MURPHY, P et al. 2004. The Antidepressant properties of the Ketogenic diet. *Biological Psychiatry*. 56: 981-983.

NEUFELD, E.F. & MUENZER, J. 2001. The mucopolysaccharidoses. (In Scriver, C.R., red. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8ste uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P3421-3468)

O'SHEA, T. 2003. Allergies: the threshold of reactivity. [Web:] [hppt:// www.health-report.co.uk](http://www.health-report.co.uk). [Date of access: 1 Aug 2004]

RAMSAY, S. L. *et al.* 2004. Determination of oligosaccharides and glycolipids in amniotic fluid by electrospray ionisation tandem mass spectrometry: in utero indicators of lysosomal storage diseases. *Molecular Genetics and Metabolism*. 83: 231-238, Jul

RAMSAY, S. L. *et al.* 2003. Determination of monosaccharide and disaccharides in mucopolysaccharidoses patients by electrospray ionization mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism*. 78: 93-204. Jan

ROE, T & Ng, W.G. 1996. Disorders of carbohydrate and glycogen metabolism, (In Duran, M. red. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic disease. 1ste uitgawe. Chapman & Hall Medical: London. P 277-294)

ROZAKLIS, T. *et al.* 2002. Determination of oligosaccharides in Pompe disease by electrospray ionization Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry. Automation and analytical techniques*. 48 (1): 131-139. Jan

SAIR, M. H. 2005. TCBD: Transportprotein classification databasis. [Web:] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>. [Date of access: 4 Mar 06].

SEGAL, I. *et al.* 1983. Lactase deficiency in South African black population. *American Journal of clinical nutrition*. 38(6): 901-905. Des.

SEGAL, S *et al.* 2006. Pathways of galactose metabolism by galactosemics: Evidence for glucose conversion to hepatic UDP-glucose. *Molecular Genetics and metabolism*. 87: 92-101. Sep, 15

SEGAL, S & BERRY, G, T. 1995. Disorder of galactose metabolism. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 6de uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P 967-1000)

SEMENZA, G & AURICCHIO, S. 1998. Small-intestinal disaccharidases. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 6de uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P4451-4480)

SEWELL, A.C. 1991. Urinary Oligosaccharides. (*In* Hommes, F.A, *red.* Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual. Wiley-Liss, Inc: United States of America. P 219-230)

SHAUER, R. 2004. Sialic Acid: fascinating sugars in higher animals and man. *Zoology*. 107: 49-64. Oct. 03

SHEN, X & PERREAULT, H. 1998. Characterization of carbohydrates using a combination of derivatization, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 811(1-2): 47-59. Jun,12

SHIH, V.E. *et al* 1991. Monosaccharide and Disaccharides. (*In* Hommes, F.A, *red.* Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual. Wiley-Liss, Inc: United States of America. P 69-86)

SHIN, Y.S. 1991 Galactose metabolites and disorders of galactose metabolism. (*In* Hommes FA, *red.* Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics. New-York, Wiley-Liss. p 267-284

SKOOG, D.A. *et al.* 1996. Fundamentals of analytical chemistry. 7de uitgawe. Saunders college publishers: Fort Worth. P 11-44

SMECUOL, E. *et al.* 1999. Sugar tests detect celiac disease among first-degree relatives, 94(12): 3547-3552. Des

SOGA, T. & ROSS, G.A. 1999. Simultaneous determination of inorganic anions, organic acids, amino acids and carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of chromatography*. 837 (1): 231-239.

STOJANOV, L. *et al.* 2005: Glycogen Storage diseases Types I-VII. eMedicine: an electronic journal. [Web:] <http://www.emedicine.com/derm/topic723.htm>. [Date of access: 4 Sep 2005]

SUN, Z. *et al.* 1998. Role of Intestinal Permeability in Monitoring Mucosal Barrier Function. *Digestive surgery*. 15 (5): 386-39

SUZUKI, Y. *et al.* β -Galactosidase deficiency: GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8ste uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P 3775-3809)

TAYLOR, K.A.C.C. 1995. A colorimetric method for quantification of fructose. *Applied Biochemistry and biotechnology*. 53(3): 215-227

THOMAS, G.H. 2001 Disorders of glycoprotein degradation: α -Mannosidosis, β -Mannosidosis, Fucosidosis and Sialidosis. (*In* Scriver, C.R., *red.* The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8ste uitgawe. McGraw-Hill: United States of America. P3507-3534)

VANDER, A *et al.* 1998. Human physiology: the mechanism of body function. 7de uitgawe. McGraw Hill: Boston. P560-589

VOET, D. & VOET, J.G. 1995. Biochemistry. 2de uitgawe. John Wiley & Sons: New York. P 251-276, 443-464, 476-510, 599-623

WAMELINK, M. M. C. *et al.* 2005. Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC-MS-MS: application to two new inherited defects of metabolism. *Journal of chromatograph B*. 823: 18-25. Jan, 23

WARDLAW, G.M. 1999. Perspectives in Nutrition. 4de uitgawe. McGraw-Hill: Boston.
p75 – 112

YOSHII, H. *et al.* 2001. Clinical usefulness of measuring urinary poyol excretion by gas chromatography/mass spectrometry in type 2 diabetes to assess polyol pathway activity. *Diabetic and Clinical Practice*. 51: 115-123. Sep, 4