

'n BIOCHEMIESE BENADERING TOT DIE IDENTIFISERING VAN PEROKSISOMALE DEFEKTE

C.M.C MARAIS Hons. B.Sc.

**Verhandeling voorgelê vir die gedeeltelike nakoming van die vereistes
vir die graad Magister Scientiae in Biochemie aan die Noordwes-
Universiteit**

Studieleier: Prof. L.J. Mienie

November 2005

Potchefstroomkampus

A BIOCHEMICAL APPROACH TO THE IDENTIFICATION OF PEROXISOMAL DISORDERS

C.M.C MARAIS Hons. B.Sc

**Dissertation submitted for the degree Master of Science at the North-West
University**

Supervisor: Prof. L.J. Mienie

November 2005

Potchefstroom Campus

*The important thing in science is not so much to obtain
new facts as to discover new ways of thinking about them*

– Sir William Bragg

DANKBETUIGINGS

Ek wil graag die volgende persone bedank wat insette in hierdie studie gehad het:

1. My **Hemelse Vader** vir die talente en geleenthede wat ek gekry het;
 2. **Prof. L.J. Mienie** my studieleier vir sy insette;
 3. **Mnr. E. Erasmus** wat vir prof. Mienie ingestaan het as studieleier in sy afwesigheid;
 4. Die **ander akademiese personeel by Biochemie** vir raad en hulp met die skryf van hierdie verhandeling;
 5. Die **laboratoriumpersoneel** by die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte vir hulle hulp, raad en motivering;
 6. **Hannes** vir jou aanmoediging en liefde.
-

ABSTRACT

Peroxisomes have an indispensable role in cellular metabolism (Wanders *et al*, 2001). Peroxisomal disorders are characterized by abnormal pathogenesis (Moser, 1999), and metabolically by accumulation of very long chain fatty acids (VLCFA), phytanic acid and pristanic acid. The estimation of these metabolites in serum is therefore the recommended first line test for diagnosing patients (Korman *et al*, 2000).

Rapid, sensitive analyses of VLCFA, phytanic acid and pristanic acid are performed through the use of gas chromatography mass spectrometry with stable isotopes of every metabolite as internal standards (Vreken *et al*, 1998). This method has been successfully implemented and standardised for the South-African population during this study.

Secondary to the primary biochemical disturbance are the excretion of dicarboxylic acids and other organic acids. Due to the absence of a simple screening test for peroxisomal disorders, the frequent absence of clinical information of patients and because the estimation of VLCFA is not part of the routine analysis of a metabolic screen, we investigated the possibility to use these secondary metabolites as a screening test.

Results on these screening metabolites concluded that the presence of secondary metabolites can be used as a screening method for peroxisomal disorders, especially peroxisomal biogenesis disorders (PBD). Because of the presence of these secondary metabolites in other metabolic diseases, the clinical information are still of great importance in the diagnosis of peroxisomal disorders.

OPSOMMING

Peroksisome speel 'n onvervangbare rol in selmetabolisme (Wanders *et al*, 2001). Peroksisomale versteurings word gekenmerk deur abnormale patogenese (Moser, 1999) en metabolies deur die opeenhoping van baie-langkettingvetsure (BLKVS/VLCFA), fitaansuur en pristaansuur. Die bepaling van hierdie metaboliete in serum is daarom die aanbeveelde eerste toets wat uitgevoer word om hierdie pasiënte te diagnoseer (Korman *et al*, 2000).

'n Vinnige sensitiewe metode vir die analisering van BLKVS/VLCFA, fitaansuur en pristaansuur word uitgevoer deur gebruik te maak van gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS) met stabiele isotope van elk van die betrokke metaboliete as interne standaarde (Vreken *et al*, 1998). Hierdie metode is tydens hierdie studie suksesvol geïmplementeer en gestandaardiseer vir die Suid-Afrikaanse populasie.

Sekondêr tot die primêre biochemiese versteurings is die uitskeiding van dikarboksielsure en ander organiese sure. Weens die gebrek aan 'n eenvoudige siftingstoets vir peroksisomale defekte, die feit dat die kliniese beeld van pasiënte nie altyd aan ons bekend is nie en omdat die bepaling van BLKVS/VLCFA nie 'n roetiene analise in 'n metaboliese sifting is nie, het ons in hierdie studie gekyk of hierdie sekondêre metaboliete gebruik kan word as 'n siftingstoets.

Uit die resultate van siftingsmetaboliete is dit dan ook duidelik dat die teenwoordigheid van hierdie sekondêre metaboliete wel as siftingsmetode vir peroksisomale defekte en veral peroksisomale-biogenese defekte (PBD) gebruik kan word. Aangesien hierdie sekondêre metaboliete egter ook by ander metaboliese siektetoestande voorkom, bly die kliniese beeld egter baie belangrik in die diagnose van peroksisomale defekte.

INHOUDSOPGAWE

Lys van figure	ix
Lys van tabelle	x
Lys van afkortings	xii
Lys van simbole	xv
Woordelys	xvi

HOOFSTUK 1 - INLEIDING	1
-------------------------------	----------

HOOFSTUK 2 - LITERATUUROORSIG	3
--------------------------------------	----------

2.1 Inleiding	3
----------------------	----------

2.2 Peroxisoombiogenese	4
--------------------------------	----------

2.2.1 Membraansamestelling	4
-----------------------------------	----------

2.2.1.1	Die primêre weg vir peroksisoombiogenese	5
---------	--	---

2.2.1.2	Die sekondêre weg vir peroksisoombiogenese	5
---------	--	---

2.2.2 Peroxisoommatriksproteïen invoer	7
---	----------

2.2.2.1	Reseptor-ligand binding	7
---------	-------------------------	---

2.2.2.2	Transport na die peroksisoom	7
---------	------------------------------	---

2.2.2.3	Reseptorkoppeling	8
---------	-------------------	---

2.2.2.4	Dissosiasie en translokasie	9
---------	-----------------------------	---

2.2.2.5	Reseptor hersirkulasie	9
---------	------------------------	---

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

2.2.3	Peroksisoombiogenese defekte	10
2.2.3.1	Die Zellwegerspektrum	10
2.2.3.2	Rhizomeliese chondrodisplasie punktata	11
2.2.3.3	Behandeling	12
2.3	Peroksisomale α-oksidase van fitaansuur	12
2.3.1	Inleiding	12
2.3.2	Volledige oksidasie van fitaansuur	13
2.3.2.1	Alternatiewe weg vir die α -oksidase van fitaansuur	16
2.3.3	Ensiemdefekte in die peroksisomale α-oksidase sisteem	17
2.3.3.1	Refsum se siekte	17
2.3.3.2	Behandeling	17
2.4	β-oksidase van pristaansuur en baie-langkettingvetsure in die peroksisome	18
2.4.1	Inleiding	18
2.4.2	β-oksidase van pristaansuur in die peroksisome	18
2.4.3	β-oksidase van baie-langkettingvetsure in die peroksisome	21
2.4.4	'n Vergelyking tussen mitochondriale en peroksisomale vetsuur β-oksidase	24

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

2.4.4.1	Volledige oksidasie van vetsure in die mitochondria vs. kettingverkorting in die peroksisome	24
2.4.4.2	Die produksie van ATP	24
2.4.4.3	Die rol van karnitien	25
2.4.4.4	Regulering van mitochondriale en peroksisomale β -oksidase	25
2.4.4.5	Substraat spesifisiteit van die peroksisomale en mitochondriale β -oksidase sisteem	25
2.4.5	Ensiemdefekte van peroksisomale vetsuur β-oksidase	26
2.4.5.1	X-gekoppelde adrenoleukodistrofie (X-ALD)	26
2.4.5.2	Asiel-KoA oksidase	27
2.4.5.3	D-Bifunksionele proteïen (D-BP)	27
2.4.5.4	α -Metielasiel-KoA rasemase	28
2.4.5.5	Peroksisomale thiolase	28
2.4.5.6	Behandeling	28
2.5	Die ω-oksidase van vetsure	28
2.5.1	Die metaboliese ontstaan van dikarboksielsuururie in peroksisomale defekte	28
2.5.2	Siftingsmetaboliete vir peroksisomale defekte	29

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

2.5.2.1	Nie-ketotiese dikarboksielsuururie	29
2.5.2.2	Hidroksi dikarboksielsure	31
2.5.2.3	Tirosielurie	31
2.5.2.4	Epoksi dikarboksielsuururie	31
2.5.2.5	Ander organiese sure wat kenmerkend is aan peroksisoomdefekte	32
2.5.3	Dikarboksielsuururie in ander gevalle	32
2.6	Doelstelling en benaderingswyse	32
HOOFSTUK 3 - STABIELE ISOTOOP VERDUNNINGS METODE VIR DIE BEPALING VAN BAIE-LANGKETINGVETSURE, FITAANSUUR EN PRISTAANSUUR		34
3.1	Inleiding	34
3.2	Reagense en chemikalieë	35
3.3	Vorbereiding van standaardoplossings	35
3.3.1	Interne standaardoplossing	35
3.3.2	Suurhidrolise-oplossing	35

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

3.3.3	Alkaliese-hidrolise-oplossing	36
3.4	Monsterversameling	36
3.5	Monstervoorbereiding	36
3.6	Die GC-MS analise	37
3.7	Verwerking van resultate	38
 HOOFSTUK 4 - METODE VIR DIE ANALISERING VAN ORGANIESE SURE IN URIENE		 39
4.1	Inleiding	39
4.2	Reagense en chemikalieë	39
4.3	Monsterversameling	39
4.4	Monstervoorbereiding	40
4.4.1	Die kreatinienwaarde	40
4.4.2	Ekstraksie van organiese sure	40
4.5	Die GC-MS analise	41
4.6	Verwerking van resultate	41

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

HOOFSUK 5 – STABIELE ISOTOOP VERDUNNINGS METODE VIR DIE BEPALING VAN BAIE-LANGKETTINGVETSURE, PRISTAANSUUR EN FITAANSUUR	43
5.1 Inleiding	43
5.1.1 Nonadekanoësuur (C19:0) en Pentakosanoësuur (C25:0) as interne standaarde	44
5.1.2 Die liniêre gebied, kalibrasiekrommes en kwantifiseringslimiete	50
5.1.2.1 Pristaansuur	50
5.1.2.2 Fitaansuur	51
5.1.2.3 Dokosanoësuur (C22:0)	51
5.1.2.4 Tetrakosanoësuur (C24:0)	52
5.1.2.5 Heksakosanoësuur (C26:0)	53
5.1.2.6 Bespreking	53
5.1.3 Herwinning van vetsure na die ekstraksieproses	53
5.1.3.1 Bespreking	56

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

5.1.4	Herhaalbaarheid van die metode	56
5.1.4.1	Intra-analise herhaalbaarheid (herhaalbaarheid van die ekstraksieproses)	56
5.1.4.2	Bespreking	58
5.1.4.3	Inter-analise herhaalbaarheid (herhaalbaarheid van die GC-MS analise)	58
5.1.4.4	Bespreking	60
5.1.5	Normaalwaardes en Normaalverspreiding	60
5.1.5.1	Normaalwaardes	60
5.1.5.2	Bespreking	62
5.1.5.3	Resultate van pasiënte met peroksisomale defekte	63
5.1.5.4	Bespreking	64
5.1.5.5	Normaalverspreiding	65
5.1.5.6	Bespreking	66
HOOFSTUK 6 – SIFTINGSMETABOLIE TE VIR PEROKSISOMALE DEFEKTE		71
6.1	Organiese suur profiele van pasiënte wat reeds met peroksisomale defekte gediagnoseer is	71
6.1.1	Gevallestudie 1	71

INHOUDSOPGAW (vervolg)

6.1.2	Gevallestudie 2	72
6.1.3	Gevallestudie 3	74
6.1.4	Bespreking	76
6.2	Onderzoek na die oorsprong van dikarboksielsuururie in ander pasiënte	76
6.2.1	Gevallestudie 4	77
6.2.2	Gevallestudie 5	78
6.2.3	Gevallestudie 6	80
6.2.4	Bespreking	81
HOOFSTUK 7 - GEVOLGTREKKING		82
7.1	Standaardisering van die stabiele isotoop verdunningsmetode	82
7.2	Siftingsmetaboliete vir peroksisomale defekte	83
LITERATUURLYS		84

LYS VAN FIGURE

Figuur 1:	Biogenese van die peroksisoommembraan	6
Figuur 2:	Peroksisoommatriksproteïen invoer	8
Figuur 3:	Fitaansuur α -oksidasie	15
Figuur 4:	Alternatiewe weg vir fitaansuur α -oksidasie	16
Figuur 5:	β -oksidasie van pristaansuur	20
Figuur 6:	β -oksidasie van heksakosanoësuur	22
Figuur 7:	ω -oksidasie van bv. palmitiensuur	30
Figuur 8:	Reaksie vergelyking van die derivatisering stap van die vetsuur	37
Figuur 9:	Reaksie vergelyking van die derivatisering stap van organiese suur	41
Figuur 10:	Chromatogram van die vetsuur standaarde	44
Figuur 11:	Chromatogram van pristaansuur	45
Figuur 12:	Chromatogram van pristaansuur-d3	45
Figuur 13:	Chromatogram van fitaansuur	46
Figuur 14:	Chromatogram van fitaansuur-d3	46
Figuur 15:	Chromatogram van C22:0	47
Figuur 16:	Chromatogram van C22-d4	47
Figuur 17:	Chromatogram van C24:0	48
Figuur 18:	Chromatogram van C24-d4	48
Figuur 19:	Chromatogram van C26:0	49
Figuur 20:	Chromatogram van C26-d4	49
Figuur 21:	Die kalibrasiekromme vir pristaansuur	50
Figuur 22:	Die kalibrasiekromme vir fitaansuur	51
Figuur 23:	Die kalibrasiekromme vir C22:0	52
Figuur 24:	Die kalibrasiekromme vir C24:0	52
Figuur 25:	Die kalibrasiekromme vir C26:0	53
Figuur 26:	Chromatogram van 'n kontrolemonster	63
Figuur 27:	Chromatogram van 'n pasiënt met 'n peroksisomale defek	63
Figuur 28:	Die normaalverspreiding van fitaansuur	67
Figuur 29:	Die normaalverspreiding van pristaansuur	67
Figuur 30:	Die normaalverspreiding van C22:0	68
Figuur 31:	Die normaal verspreiding van C24:0	68
Figuur 32:	Die normaalverspreiding van C26:0	69
Figuur 33:	Die normaalverspreiding van die C24:C22 verhouding	69
Figuur 34:	Die normaalverspreiding van die C26:C22 verhouding	70

LYS VAN TABELLE

Tabel 1:	Enkele ioon monitoring	38
Tabel 2:	Die herwinning van elk van die vetsure wat op die standaardde uitvoer is	54
Tabel 3:	Die herwinning van elk van die vetsure wat op die verrykte serummonster uitgevoer is	55
Tabel 4:	'n Vergelyking tussen die herwinningsresultate van verrykte serummonsters wat in hierdie studie verkry is en die resultate wat in die literatuur gegee word	55
Tabel 5:	Konsentrasies van die tien ekstraksies, gemiddeld, standaardafwyking en koëffisiënt van variasie	57
Tabel 6:	'n Vergelyking tussen die intra-analise herhaalbaarheid wat in hierdie studie verkry is en dit wat in die literatuur voorkom	58
Tabel 7:	Die gemiddelde konsentrasie en die koëffisiënt van variasie om die herhaalbaarheid van die GC-MS analise te toets	59
Tabel 8:	'n Vergelyking tussen die inter-analise herhaalbaarheid wat in hierdie studie verkry is en dit wat in die literatuur gegee word	59
Tabel 9:	Konsentrasies van die vetsure die C24:C22 en die C26:C22 verhoudings vir die vyftig kontrolemonsters, sowel as die mediaan- en standaardafwykings waaruit die normaalgrense bereken is	60
Tabel 10:	Normaalgrense van die vetsure en vetsuurverhoudings soos bereken vir 'n 95% vertrouensinterval	62
Tabel 11:	Die gemiddelde waardes, standaardafwyking en die 95% vertrouensintervalgrense wat verkry is vir die 7 individue met moontlike peroksisomale defekte	64
Tabel 12:	Resultate wat verkry is in die Shapiro-Wilk toets vir normaalverspreiding en die T-toets om aan te toon of die pasiëntgroep statisties betekenisvol van die kontrolegroep verskil	66
Tabel 13:	Die BLKVS/LCFA resultate wat verkry is vir die pasiënt in gevallestudie 1	72
Tabel 14:	Die organiese suur resultate van die pasiënt in gevallestudie 1	72
Tabel 15:	Die BLKVS/LCFA resultate van die pasiënt in gevallestudie 2	73
Tabel 16:	Die organiese suur resultate van die pasiënt in gevallestudie 2	73
Tabel 17:	Die BLKVS/LCFA resultate vir die pasiënt in gevallestudie 3	74
Tabel 18:	Resultate van die eerste organiese suur analise van die pasiënt in gevallestudie 3	75

Tabel 19:	Resultate van die tweede organiese suur analise van die pasiënt in gevallestudie 3	75
Tabel 20:	Die resultate van die organiese suur analise vir die pasiënt in gevallestudie 4	77
Tabel 21:	Die resultate wat verkry is vir die BLKVS/VLCFA analise van die pasiënt in gevallestudie 4	78
Tabel 22:	Die organiese sure wat in die uriene teenwoordig is van die pasiënt in gevallestudie 5	79
Tabel 23:	Die BLKVS/VLCFA resultate van die pasiënt in gevallestudie 5	79
Tabel 24:	Die organiese suur resultate van die pasiënt in gevallestudie 6	80
Tabel 25:	Die BLKVS/VLCFA resultate van die pasiënt in gevallestudie 6	81

LYS VAN AFKORTINGS

[M – 57] ⁺ :	[Massa – 57] ⁺
2HPCL:	2-Hidroksi-fitanoïel-KoA-liase
A:	Alanien
AAA:	ATPase geassosieer met diverse sellulêre aktiwiteit
ABC-transporters:	ATP-bindingskasset transportersaktiwiteit
ALDH10:	Aldehydedehidrogenase 10
AMDIS:	Automated mass spectral deconvolution and identification system
AMN:	Adrenomeïeloneuropatie
AMP:	Adenosienmonofosfaat
ATP:	Adenosientrifosfaat
BSTFA:	Bis(trimetielsiliel)trifluoroasetamied
C:	Cysteine / Sisteïen
C22:0	Dokosanoësuur
C24:0	Tetrakosanoësuur
C26:0	Heksakosanoësuur
CACT:	Karnitien/asielkarnitientranslokase
CAT:	Karnitienasieltransferase
CO ₂ :	Koolstofdioksied
COT:	Karnitienoktanoïeltransferase
CPT I:	Karnitienpalmitoïeltransferase I
CPT II:	Karnitienpalmitoïeltransferase II
C-terminaal:	Karboksie-terminaal
C.V.:	Korrelasie koëffisiënt
d3:	Deuterium 3
d4:	Deuterium 4
D-BP:	D-Bifunksioneleproteïen
DHCA:	Dihidroksicholestanoësuur
ER:	Endoplasmiese Retikulum
eV:	Elektronvolt
FAD:	Flavienadeniendinukleotied, geoksideerde vorm
FADH ₂ :	Flavienadeniendiknukleotied, gereduseerde vorm
Fe ²⁺ :	Yster
GC-MS:	Gaschromatografie Massaspektrometrie

Gemid:	Gemiddeld
GTP:	Guanientrifosfaat
H:	Histidien
H ₂ O ₂ :	Waterstofperoksied
HCl:	Soutsuur
HMG:	Hidroksimetielglutariel
HP:	Hewlett Packard
I:	Isoleusien
IS:	Interne standaard
k:	Konsentrasie
K:	Lisien
KoA:	Ko-ensiem A
L:	Leusien
l:	Liter
LCAD/LKAD:	Langkettingasiel-KoA-dehidrogenase
LCHAD/LKHAD:	Langkettinghidroksi-asiel-KoA-dehidrogenase
m:	Meter
M:	Metionien
M:	Molaar
MCAD/MKAD:	Mediumkettingasiel-KoA-dehidrogenase
mg:	Milligram
Mg ²⁺ :	Magnesium
min:	Minute
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mmol:	Millimol
mPTS:	Peroksisoommembraanteikensein
Mr:	Molekulêre massa
MTBSTFA:	N-metiel-N-(tert-butioldimetielsiliel)trifluoroasetamied
Na ₂ SO ₄ :	Natriumsulfaat
NAD ⁺ :	Nikotienamiedadeniendinukleotied, geoksideerde vorm
NADH:	Nikotienamiedadeniendinukleotied, geoksideerde vorm
NADPH:	Nikotienamiedadeninedinukleotiedfosfaat, gereduseerde vorm
NaOH:	Natriumhidroksid
N-terminaal:	Amino-terminaal
O ₂ :	Suurstof
OH:	Hidroksi
P:	Fosfaat
PBD:	Peroksisoombiogenese defekte

psi:	Eenheid van druk
PTS1 & PTS2:	Peroksisoomteikensein 1 en 2
Q:	Glutamien
R:	Arginien
Rf:	Responsfaktor
S:	Serien
SCAD/KKAD:	Kortkettingasiel-KoA-dehidrogenase
SIM:	Enkelioonmonitor (Single ion monitor)
Std af:	Standaardafwyking
THCA:	Trihidroksicholestanoësuur
TMCS:	Trimetielchlorosilaan
V:	Valien
VLCFA/BLKVS:	Baie-langkettingvetsure
X-ALD:	X-gekoppelde adrenoleukodistrofie
μ l:	Mikroliter
μ m:	Mikrometer
μ mol:	Mikromol

LYS VAN SIMBOLE

α :	Alfa
β :	Beta
ω :	Omega
$<$:	Kleiner as
$>$:	Groter as
%:	Persentasie
$^{\circ}\text{C}$:	Grade Celcius

WOORDELYS

Addison se siekte:

'n Kroniese tipe adrenokortikale ondoeltreffendheid, wat gekenmerk word deur hipotensie, gewigsverlies, anoreksie, swakheid en 'n bronsagtige hiperpigmentasie van die vel. Dit ontstaan as gevolg van tuberkulose- of outo-immuungeïnduseerde vernietiging van die adrenale korteks, wat lei tot versteurde aldosteroon en kortisol sekresie. Hierdie siektetoestand is fataal in die afwesigheid van vervangingsterapie.

Adrenoleukodistrofie:

'n X-gekoppelde resessiewe siektetoestand wat gekenmerk word deur diffuse abnormaleite van die serebellêre witstof, adrenale atrofie, verstandelike agteruitgang wat kan lei tot demensie en die verlies van sig.

Adrenomeïeloneuropatie:

'n Oorerflike toestand wat verwant is aan adrenoleukodistrofie, maar wat ook rugmurgdegenerasie en perifere neuropatie insluit.

Anosmie:

Onvermoë om te ruik.

Asidose:

Die patologiese toestand wat ontstaan as gevolg van die akkumulasie van suur en waterstofione of verlaagde bikarbonaathoud in die bloed- en liggaamswaefsel, wat lei tot verlaging in pH.

Brushfield kolle:

Klein wit kolle wat voorkom op die periferie van die iris.

Dikarboksielsuururie:

Uitskeiding van hoë vlakke dikarboksielsure in die uriene. Dit kom gewoonlik voor as die β -oksidase van vetsure geblokkeer is en ω -oksidase hoofsaaklik plaasvind.

Glikogeenstoringsdefekte:

'n Defek in glikogeenfosforilase wat 'n outosomaal resessiewe eienskap is.

Glutaarsuururie:

'n Outosomaal resessiewe siektetoestand wat gekenmerk word deur akkumulasie en uitskeiding van glutaarsuur in die uriene. Daar bestaan twee tipes. Tipe 1 ontstaan as gevolg van 'n defek in die glutariel-KoA-dehidrogenase ensiem en Tipe 2 as gevolg van 'n defek in die elektronoordragflavoproteïen of elektronoordragflavoproteïen:ubiquinoon oksido-reduktase.

Hepatomegalie:

Vergroting van die lewer.

Hipoglisemie:

'n Abnormaal verlaagde konsentrasie glukose in die bloed, wat kan lei tot bewing, koue sweet, hipotermie en hoofpyn en - indien chronies en ernstig is - kan dit lei tot sentrale senuweesisteammanifesterings wat soms fataal kan wees.

Hipotonie:

Verlaagde tonus van skeletspiere en verlaagde weerstand van spiere teen passiewe strekking.

Jamaika vomeringsiekte:

Hierdie siektetoestand word veroorsaak deur die inname van 'n vrug met die naam "ackee" in Jamaika en word gekenmerk deur vomering en diarree en ernstige hipoglisemie wat kan lei tot epilepsie, koma en die dood.

Kardiomiopatie:

'n Algemene diagnostiese term wat hoofsaaklik non-inflammatoriese siekte van die hartspier insluit. Die ontstaan van kardiomiopatie is dikwels onbekend en nie 'n resultaat van ischemie, hipertensie, kongenitale klep- of perifere siekte nie.

Ketose:

Abnormaal verhoogde konsentrasies ketoonliggame in die liggaamswaefsel en vloeistof wat ontstaan as vetsure onvolledig gemetaboliseer word.

Komplementasie:

Die interaksie tussen twee stelle sellulêre- of virale gene in dieselfde sel, sodat die sel kan funksioneer selfs al dra elke stel gene 'n gemuteerde non-funksionele geen. Dit toon aan dat die defekte nie identies is nie.

Laktaatasidose:

Ernstige verhoging van laktaat in die bloed en 'n verlaging van die bloed pH.

Makrosefalie:

Ongewone vergroting van die kop.

Mikrognasia:

Ongewone klein onderkaak.

Neonatale adrenoleukodistrofie:

Adrenoleukodistrofie wat alreeds teenwoordig is in die eerste vier weke van lewe. Neonatale adrenoleukodistrofie is deel van die Zellwegerspektrum.

Nistagmus:

'n Onwillekeurige, vinnige, ritmiese beweging van die oë, wat horisontaal, vertikaal, roterend of gekombineerd kan voorkom.

Perifere neuropatie:

'n Funksionele versteuring of patologiese verandering wat gelyktydig in verskeie perifere senuwees voorkom.

Proteïenurie:

Die teenwoordigheid van 'n oormaat serum proteïene in die uriene. Dit kom algemeen voor in renale siektetoestande, na intense oefening en tydens dehidrasie.

Psigomotoriese:

Dit verwys na motoriese gevolge van serebellêre- of psigiese aktiwiteite.

Refsum se siekte:

'n Outosomaal resessiewe versteuring in die lipiedmetabolisme, waarin 'n defek van die ensiem fitaansuur α -hidroksilase lei tot die akkumulasie van fitaansuur. Die kliniese simptome is hoofsaaklik kroniese polineuritis, retinis pigmentosa, serebellêre ataksie en volgehoue verhoging van proteïene in die serebrospinale vloeistof.

Renale siste:

'n Abnormale, geslote holte in die renale sisteem, wat uitgevoer is met epiteelselle en gevul is met 'n vloeistof of 'n semi-soliede materiaal.

Retinitis pigmentosa:

'n Groep siektetoestande wat dikwels oorerflik is en gekenmerk word deur progressiewe verlies van retinale response, retinale atrofie, attenuasie van die retinale vat en klontvorming van die pigment. Dit kan dominant, resessief of X-

gekoppel oorgeërf word en kom dikwels voor in assosiasie met ander genetiese defekte.

Retinopatie:

Enige nie-inflammatoriese toestand van die retina.

Rhisomelie:

Dit verwys na die heupgewrig of die skouergewrig.

Rhizomeliese chondrodisplasie punktata:

'n Fatale outosomaal resessiewe siektetoestand wat gekenmerk word deur die verkorting van proksimale ledemate, ernstig versteurde endochondriale beenvorming en verstandelike gestremdheid.

Rye sindroom:

'n Rare, akute, somtyds fatale siektetoestand wat in kinders voorkom wat gekenmerk word deur herhaalde vomering en verhoogde serum transaminasevlakke, met onderskeidelik veranderinge van die lewer en ander organe.

Sensori-neurale doofheid:

Doofheid as gevolg van 'n letsel in die koglea, die vestibulokogleale senuwee, die sentrale neurale weë, of 'n kombinasie van hierdie strukture.

Serebellêre ataksie:

'n Tekort aan spierkoördinasie of ongereeelde spieraksie wat ontstaan as gevolg van siekte in die serebellum.

Serebellêre gigantisme:

Abnormale groei, of oormatige grootte of statur in die afwesigheid van verhoogde vlakke groeihormone. Dit kan toegeskryf word aan serebellêre defekte. Kinders is te groot vir hul ouderdom, met groot hande en voete. Dit lei tot lompheid en kan gepaard gaan met verstandelike gestremdheid wat wissel in graad van aantasting. Dit word ook Sotos-sindroom genoem.

Tirosielurie:

Die verhoogde uitskeiding van para-hidroksifenielverbindings afkomstig vanaf tirosien, soos wat voorkom by tirosienemie.

Konvulsies:

Die onwillekeurige kontraksie of 'n reeks kontraksies van die willekeurige spiere.

Zellweger sindroom:

'n Outosomaal resessiewe versteuring wat gekenmerk word deur kranio gesigsabnormaliteite, hipotonie, hepatomegalie, polisistiese niere, geelsug en dood in die vroeë kinderjare. Dit word geassosieer met die afwesigheid van peroksisome in die lewer en niere.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Volgens die *Dorland's Illustrated Medical Dictionary* (DIMD:30) word aangebore metaboliese defekte gedefinieer as geneties bepaalde biochemiese versteurings waarin 'n spesifieke ensiemdefek 'n metaboliese blokkasie veroorsaak wat patologiese gevolge tydens geboorte of later in die lewe kan hê.

Die peroksisoom is 'n selorganel wat in bykans alle eukariotiese selle teenwoordig en by 'n verskeidenheid kataboliese en anaboliese prosesse betrokke is. Die belang van peroksisome vir die mens word beklemtoon deur die bestaan van 'n groep genetiese siektetoestande waarin daar 'n versteuring is in een of meer van die peroksisomale funksies (Wanders *et al*, 2001).

Geneties bepaalde peroksisomale versteurings word onderverdeel in twee hoofkategorieë, naamlik die peroksisoombiogenese versteurings (waartydens die organel nie normaal gevorm word nie) en versteurings waarby enkele peroksisomale ensieme defek is (Moser, 1999). Daar is tans 18 bekende defekte naamlik: Zellweger sindroom, pseudo Zellweger sindroom, D-Bifunksionele proteïendefek, adrenoleukodistrofie (3 tipes), Refsum se siekte (2 tipes), rhizomeliese chondrodiasplasie punktata (3 tipes), glutariel-KoA-oksidasie defek, hiperoksaalurie (2 tipes), mevaloonsuururie, hiperpipekoliensuururie, akatalasemie en 2-metielasiel-KoA-rasemase defek (Beukema, 2004).

Diagnostiese analises van die defekte is kompleks en sluit analises van baie-langkettingvetsure (BLKVS/VLCFA), fitaansuur, pristaansuur, plasmalogene en pipekoliensuur in. Die lae konsentrasies van die verbindings en hoë molekulêre massas dra by tot die kompleksiteit van die analises.

In hierdie studie is daar veral gefokus op die peroksisoombiogenese versteurings, versteurings van die peroksisomale α -oksidasie en versteurings van die peroksisomale β -oksidasie. Dit vereis die implementering en standaardisering van 'n stabiele isotoop verdunningsmetode vir die bepaling van BLKVS/VLCFA, pristaansuur en fitaansuur.

Die voorkoms van dikarboksielsure en ander verbindings in die uriene van pasiënte kan ook leidend wees tot die identifisering van peroksisomale defekte. In hierdie studie word daar verder ondersoek ingestel na hierdie metaboliete en die moontlike gebruik daarvan as siftingsmetaboliete.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 Inleiding

In die vroeë 1950's is peroksisome as ware organelle geïdentifiseer op grond van hulle morfologie (Wanders *et al*, 2001). Die organelle is peroksisome genoem omdat hulle waterstofperoksied produserende ensieme sowel as katalase ensieme bevat, wat 'n waterstofperoksied degraderingsensiem is (Wanders *et al*, 2000; 2001).

Peroksisome het moontlik net soos die mitochondria uit primitiewe kommensalistiese bakterieë (Wierzbicki *et al*, 2002) ontstaan. Hulle is sferiese organelle (Brown & Baker, 2003; Gärtner, 2003) en kom in alle menslike selle behalwe volwasse eritrosiete voor (Moser, 1999). Hulle morfologie verskil in verskillende weefsels en ook in verskillende spesies, maar is tipies tussen 0.1 – 1 μm in deursnee en word omring met 'n enkele lipiedbilaag (Brown & Baker, 2003). Omdat die peroksisoommembraan ondeurlaatbaar is vir protone en kleiner metaboliete, skep dit 'n ensiematiese- en chemiese unieke mikro-omgewing in die sel (Gould & Valle, 2000). Die peroksisoommembraan bevat 'n unieke stel peroksisoommembraanproteïene en peroksisoommatriksproteïene met geskikte peroksisoomteikenseine (PTS1 of PTS2) (Wanders *et al*, 2001). Peroksisome bevat ongeveer 70 ensieme wat betrokke is by verskeie metaboliese prosesse en die aantal peroksisome per sel wissel na gelang van die metaboliese aktiwiteit van daardie sel (Gärtner, 2003).

Die anaboliese funksies van peroksisome sluit die biosintese van cholesterol (Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003) en plasmalogene vir sel- en neuronale membrane (Wierzbicki *et al*, 2002) in. Peroksisome is ook in staat om 'n wye reeks lipiede te kataboliseer. Dit sluit in baie-langkettingvetsure (BLKVS/VLCFA) (>C22), onversadigde vetsure en galsuurintermediëre (Mukherji *et al*, 2003, Wanders *et al*, 2003), 2-metielvetsure (bv. pristaansuur), 3-metielvetsure (bv. fitaansuur) en eterfosfolipiede (Mukherji *et al*, 2003).

2.2 Peroxisoombiogenese

Die PEX gene kodeer vir peroksisoomproteïene, die peroksiene, wat op die vrye ribosome in die sitosol gesintetiseer word. Die peroksiene word dan post-translasioneel in die peroksisoom ingevoer (Moser, 1999; Fujiki, 2000; Gould & Valle, 2000; Brown & Baker, 2003; Gärtner, 2003).

Peroksiene word in vier groepe verdeel: (1) dié wat vereis word vir die invoer van matriksproteïene, (2) dié verantwoordelik vir die samestelling van die peroksisoommembraan, (3) dié wat betrokke is by die fusie van die membraan en (4) dié wat betrokke is in die vermeerdering van peroksisome (Fujiki, 2000).

Daar is huidiglik 27 gene bekend wat kodeer vir hierdie peroksiene (Brown & Baker, 2003). Mutasies in hierdie gene lei tot verskeie siektetoestande in die mens (Gould & Valle, 2000), wat in twee hoofkategorieë verdeel kan word. Eerstens is daar defekte van die peroksisoombiogenese, waarin die peroksisoom nie normaal gevorm word nie (Moser, 1999; Gould & Valle, 2000; Brown & Baker, 2003; Gärtner, 2003). Tweedens kom daar defekte voor waarin slegs enkele peroksisoomensieme betrokke is. Die peroksisoombiogenese defekte (PBD) sluit veelvuldige peroksisoomproteïene in, waarvan daar reeds 12 defekte in mense geïdentifiseer is (Moser, 1999; Brown & Baker, 2003; Gärtner, 2003).

Die biogenese van die peroksisoom vereis die vorming van 'n lipiedbilaag, die invoer van membraanproteïene, die transport van oplosbare proteïene oor die membraan na die peroksisoommatriks (Gould, 2001), asook die uiteindelijke vermeerdering van peroksisome.

2.2.1 Membraansamestelling

Die proses van peroksisoommembraanbiogenese is nog nie baie goed bekend nie (Moser, 1999; Gould, 2001; Brown & Baker, 2003), maar daar is twee moontlike weë wat gevolg word. Dit sluit in die klassieke- of primêre weg wat die groei en verdeling van reeds bestaande peroksisome insluit en die *de novo* sintese of sekondêre weg, wat vereis dat peroksisoomvesikels gegenereer word uit pre-peroksisomale

kompartemente vanuit 'n ander endomembraan, byvoorbeeld die endoplasmiese retikulum (ER) (Fujiki, 2000; Gould & Valle, 2000; Brown & Baker, 2003).

2.2.1.1 Die primêre weg vir peroksisoombiogenese

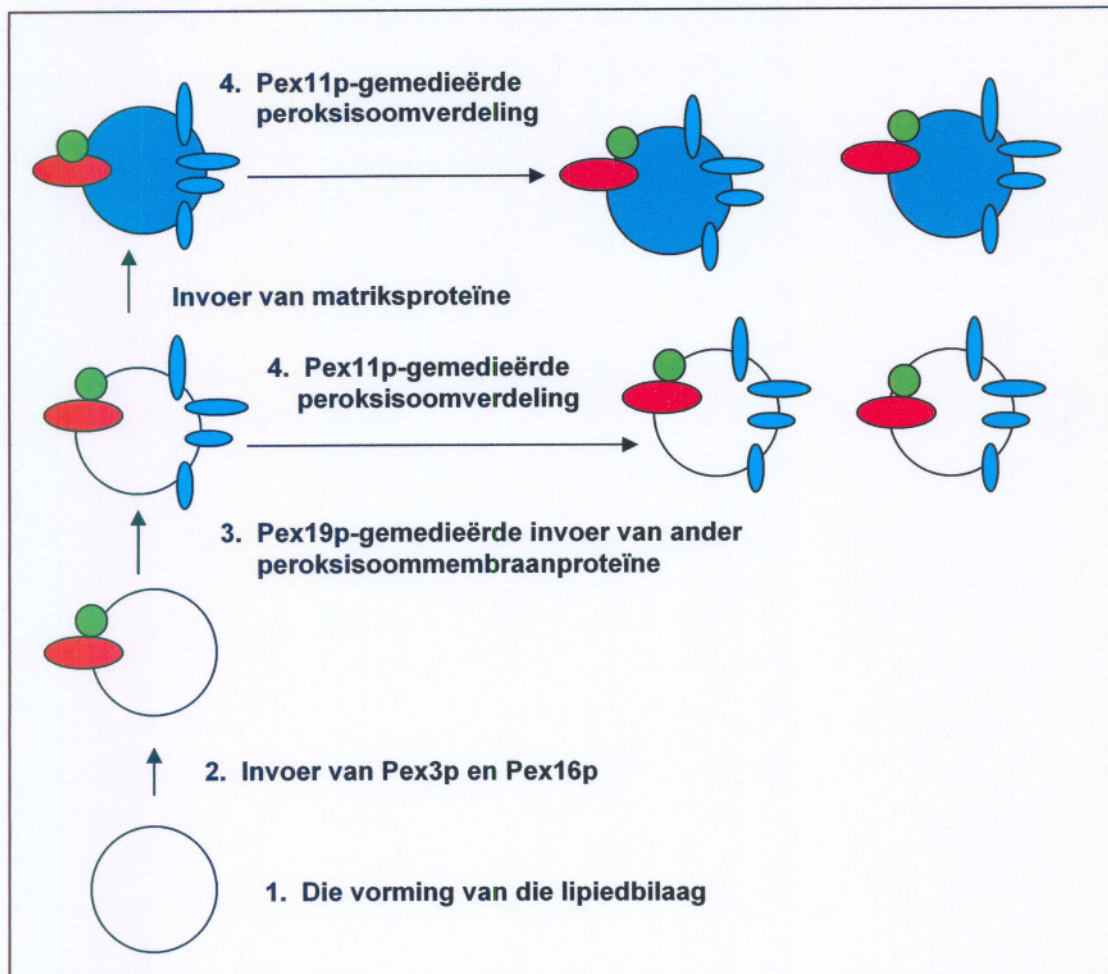
Die verdeling van reeds bestaande peroksisome word bemiddel deur 'n familie van integrale peroksisoommembraanproteïene. Die groei van die organelle is 'n resultaat van Pex5p- en Pex7p-bemiddelde opname van nuut gesintetiseerde peroksisoommatriksproteïene en die Pex19p-bemiddelde opname van peroksisoommembraanproteïene. Peroxisoomverdeling word bemiddel deur Pex11p (Gould & Valle, 2000).

2.2.1.2 Die sekondêre weg vir peroksisoombiogenese

De novo sintese van peroksisome sluit in die vorming van die lipiedbilaag en die invoer van membraanproteïene in. Die drie peroksiene wat betrokke hierin is, is Pex3p, Pex16p en Pex19p (Gould, 2001; Gould & Valle, 2000; Brown & Baker, 2003). 'n Vierde peroksien, Pex11p, is betrokke in peroksisoomvermeerdering (Gould, 2001). Die meganisme van membraanproteïeninvoer verskil van die meganisme wat gebruik word vir matriksproteïeninvoer. In verskeie studies is die teikeninformatie vir peroksisoommembraanproteïene ondersoek, maar tot dusver is daar slegs 'n klein volgorde geïdentifiseer as 'n peroksisoommembraan teikensein (mPTS) (Brown & Baker, 2003).

Die eerste stap in die biogenese van die peroksisoommembraan is die vorming van die lipiedbilaag (Figuur 1). Hoewel baie organelle gevorm word vanaf die ER, is die rol van die ER in peroksisoombiogenese nog nie duidelik nie. Dit is moontlik dat die lipiedbilaag gevorm word in 'n stap voor Pex3p, Pex16p en Pex19p betrokke raak in die proses en dat dit afhanklik is van proteïene wat nog nie geïdentifiseer is nie. Dit is ook moontlik dat klein hoeveelhede van Pex3p en Pex16p die vermoë het om die aanvanklike bilaag te vorm voor die Pex19p-afhanklike stap (Gould, 2001).

Nadat die lipiedbilaag gevorm is, word Pex3p en Pex16p ingevoer (Figuur 1). Hierdie twee proteïene word benodig om die peroksisoommembraan te vorm. Dit is dus moontlik dat dit plaasvind voor die invoer van ander peroksisoommembraanproteïene (Gould, 2001).



Figuur 1: Biogenese van die peroksisoommembraan (Gould, 2001).

Die volgende stap in die peroksisoommembraanbiogenese is die Pex19p-afhanklike invoer van ander peroksisoommembraanproteïne (Figuur 1). Pex19p kan bind aan 14 verskillende peroksisoommembraanproteïne, elk met 'n eie funksie. Pex19p het die vermoë om membraanproteïne oplosbaar te maak vir transport na die peroksisoommatriks (Gould, 2001) en ook die inplasing van peroksisoommembraanproteïne wat tot die ontstaan van volledige en funksionele peroksisome lei (Brown & Baker, 2003). Dit is moontlik dat ander proteïne 'n kompleks vorm met Pex19p om proteïne na die peroksisoom te transporteer (Gould, 2001).

Pex11p is verantwoordelik vir die vermeerdering van peroksisome nadat die peroksisoommembraan volledig gevorm is (Figuur 1).

2.2.2 Peroxisoommatriksproteïeninvoer

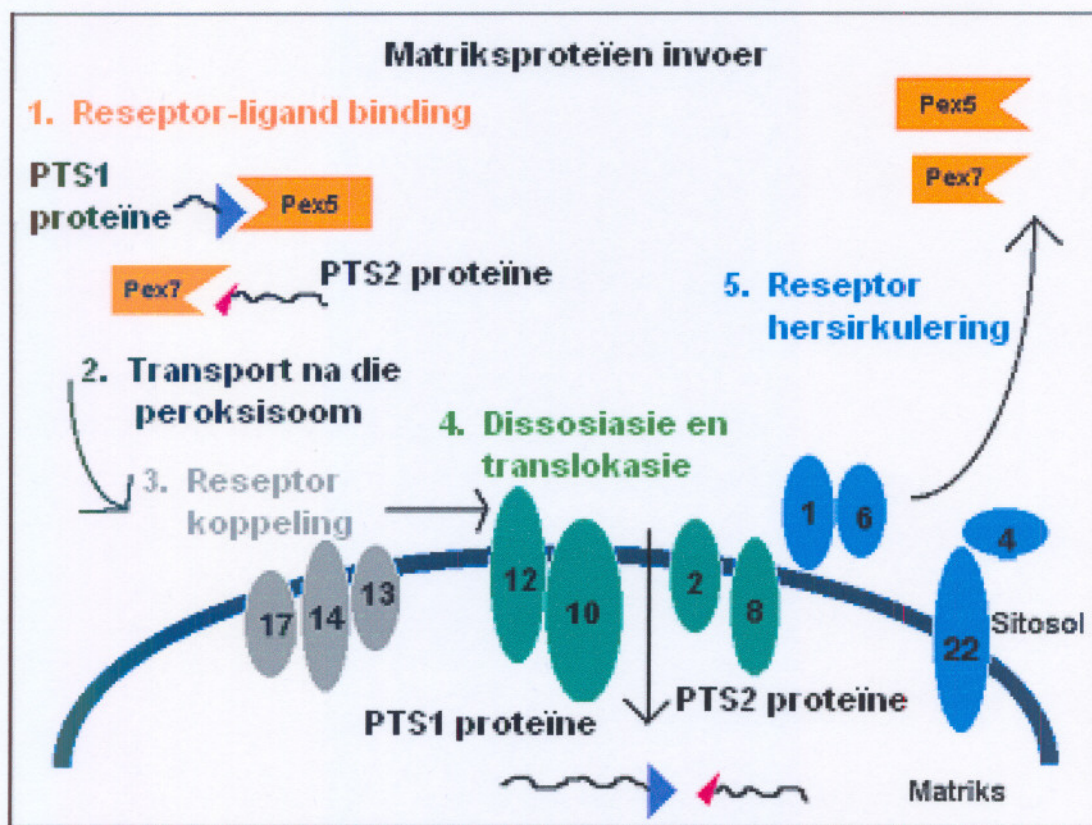
Daar bestaan twee teikenvolgordes vir die invoer van peroksisoommatriksproteïene, naamlik (1) die peroksisoom teikensein 1 (PTS1), (Moser, 1999; Brown & Baker, 2003) en (2) die peroksisoom teikensein 2 (PTS2) (Gould, 2001; Brown & Baker, 2003). PTS1 het 'n karboksieterninaal tripeptiedmotief met die konsensusvolgordes (S/AC)(K/R/H)(L/M), (Moser, 1999; Brown & Baker, 2003) en teiken die meeste bekende peroksisoommatriksproteïene (Gould, 2001; Fujiki, 2000; Brown & Baker, 2003). PTS2 is 'n nonapeptied gelokaliseer naby die aminoterninaal en bestaan uit die baie algemene konsensus volgorde (R/K)(L/V/I)X₅(H/Q)(L/A) (Moser, 1999; Brown & Baker, 2003). PTS2 teiken die volgende ensieme na die matriks: thiolase, fitanoïel-KoA-hidroksilase en dihidroksiasetoonfosfaatsintase (Moser, 1999; Gould, 2001). Die gene PEX5 en PEX7 kodeer onderskeidelik vir die reseptore van PTS 1 en PTS 2 (Fujiki, 2000; Gould & Valle, 2000). Peroxisoommatriksproteïeninvoer bestaan uit 5 stappe:

2.2.2.1 Reseptor-ligand binding

Die Pex5p en Pex7p bemiddel die aanvanklike stap in peroksisoommatriksproteïeninvoer (Figuur 2). Pex5p en Pex7p is hoofsaaklik sitoplasmies-, gedeeltelik peroksisoomproteïene (Gould & Valle, 2000) wat onderskeidelik PTS1 en PTS2, herken (Fujiki, 2000; Gould, 2001). Hierdie reseptore bind aan die ligand in die sitoplasma, moontlik met die hulp van begeleierproteïene (Gould, 2001). Defekte in enige van hierdie peroksiene veroorsaak 'n defek in matriksproteïeninvoer (Gould & Valle, 2000).

2.2.2.2 Transport na die peroksisoom

Daar is min bekend oor die meganisme waarmee die reseptor die ligand na die peroksisoom transporteer (Gould, 2001).



Figuur 2: Peroksisoommatriksproteïeninvoer (Gould, 2001).

2.2.2.3 Reseptorkoppeling

Die volgende fase in die matriksproteïeninvoer is die koppeling van die gebonde PTS-reseptorkompleks op die peroksisoommembraan aan 'n ander kompleks wat die Pex13p, Pex14p en Pex17p peroksiene insluit (Figuur 2) (Gould, 2001). Pex13p is 'n integrale peroksisoommembraanproteïen met beide die amino- en die karboksieterminaal gerig na die sitosol (Gould & Valle, 2000). Pex13p besit 'n aantal SH3-domeine wat betrokke is by proteïen-proteïen binding en bind aan beide die PTS1- en PTS2-reseptor (Gould, 2001). Pex14p is ook 'n integrale peroksisoommembraanproteïen (Fujiki, 2000; Brown & Baker, 2003), met die N- en C-terminale gerig na die sitosol (Fujiki, 2000). Pex5p en Pex7p bind beide aan Pex14p (Fujiki, 2000; Gould, 2001). Pex17p is 'n perifere peroksisoommembraanproteïen wat deel is van die bindingskompleks deur te bind aan Pex14p. Daar is nog geen Pex17p homolog in mense geïdentifiseer nie (Gould, 2001).

2.2.2.4 Dissosiasie en translokasie

Daar bestaan twee modelle vir die dissosiasie, translokering en hersirkulering: (1) die uitgebreide verskuiwingsmodel en (2) die eenvoudige verskuiwingsmodel. Die uitgebreide verskuiwingsmodel stel voor dat die reseptor-ligand kompleks vry getranslokeer word tot in die matriks van die peroksisoom, waar dit dan in die matriks dissosieer. Die reseptor word dan terug na die sitosol vervoer sodat die proses herhaal kan word. Die eenvoudige verskuiwingsmodel verskil in dié opsig dat die reseptor-ligand kompleks op die buite-oppervlak van die peroksisoom bly en nie as 'n kompleks getranslokeer word nie. Die dissosiasie vind plaas tydens koppeling. Dit wil voorkom asof die uitgebreide verskuiwingsmodel die waarskynlike model is (Brown & Baker, 2003).

Die membraanproteïene wat benodig word vir dissosiasie en translokasie is, Pex2p, Pex10p en Pex12p wat almal C3HC4-sink-bindingsmotiewe bevat. Al drie hierdie proteïene is integrale membraanproteïene met beide die N- en C-terminaal na die sitoplasma gerig (Gould, 2001). Hierdie peroksiene is stroomaf van die reseptorkoppelingskompleks geleë (Figuur 2).

2.2.2.5 Reseptor hersirkulasie

Om die proses van matriksproteïen invoer te onderhou, word addisionele peroksiene vereis om (1) die ligandbinding te breek en (2) die reseptor terug te laat keer na die sitoplasma. Hierdie peroksiene sluit Pex1p, Pex6p, Pex4p en Pex22p (Brown & Baker, 2003) in. Pex5p word teruggesirkuleer (Fujiki, 2000; Gould, 2001), nadat die ligand in die peroksisoommatriks ingevoer is. Hierdie hersirkulering word bemiddel deur Pex1p, Pex6p en Pex4p (Figuur 2) (Gould, 2001). Pex1p en Pex6p is beide membraanproteïen-geassosieerde ATPases van die AAA familie (ATPase geassosieer met diverse sellulêre aktiwiteite) (Gould, 2001; Brown & Baker, 2003), wat hoofsaaklik in die sitoplasma voorkom (Gould, 2001). Dit is die enigste bekende ATPases wat benodig word vir matriksproteïen invoer (Brown & Baker, 2003). Pex1p word ook benodig vir die stabiliteit van Pex5p, die PTS1 reseptor (Gould, 2001). Pex22p en Pex4p is nog nie in mense aangetoon nie en daarom is die rol daarvan in die peroksisoombiogenese nie bekend nie (Gould, 2001; Brown & Baker, 2003).

2.2.3 Peroksisoombiogenese defekte

2.2.3.1 Die Zellwegerspektrum

Die Zellwegerspektrum bestaan uit die volgende drie siektetoestande: Zellweger sindroom, Neonatale adrenoleukodistrofie en Refsum-se-siekte-in-kinders (Gould, 2001; Gärtner, 2003). Saam met Rhizomeliese chondrodysplasie punktata word hierdie defekte die Peroksisoombiogenese defekte (PBD) genoem. Hierdie defekte word veroorsaak deur defekte in enige van die gene waarvan die produkte noodsaaklik is vir die behoorlike samestelling van die peroksisoom. Die onderskeid tussen die defekte word gebaseer op die graad van aantasting, met Zellweger sindroom as die ernstigste en Refsum-se-siekte-in-kinders as matig. Hierdie siektetoestande word outosomaal resessief oorgeërf. Die voorkoms wissel tussen 1/25 000 en 1/50 000 geboortes (Gould, 2001). Daar is ten minste elf onderskeie komplementasiegroepe in die Zellwegerspektrum en feitlik alle pasiënte toon defektiewe PTS1 en PTS2 proteïen invoer (Gould & Valle, 2000).

Die Zellweger sindroom fenotipe word veroorsaak deur mutasies in enige van die verskeie gene betrokke by peroksisoom biogenese (McKusick, 2004). Zellweger sindroom word gekenmerk deur 'n reeks neurale, hepatiese en renale defekte. Individue met Zellweger sindroom toon ernstige neurologiese disfunksie en sterf gewoonlik binne die eerste jaar van lewe (Gould & Valle, 2000; Gärtner, 2003). Omvattende ontwikkelingsversteuring is die uitstaande onderskeidende eienskap van Zellweger sindroom en die oorsaak is die onvolledige migrasie van neuroblaste tydens ontwikkeling. Dit gaan dikwels gepaard met ernstige skedelabnormaliteite, insluitende 'n hoë voorkop, 'n plat agterkop, 'n groot fontanel, 'n breë nasale brug, vlak gebiede onder die wenkbroue en 'n hoë boogagtige verhemelte. 'n Ander tipiese eienskap van die Zellwegerspektrum sluit abnormaliteite van die oë in, byvoorbeeld Brushfieldkolle, katarakte en gloukoom. Hepatomegalie, renale siste, versteurde adrenokortikale funksie en hipotonie kom ook algemeen voor (Gould, 2001).

Neonatale adrenoleukodistrofie word veroorsaak deur mutasies in die PTS1 reseptorgeen of die Pex1p. Daar is ook al mutasies in die PEX10 en PEX13 gene waargeneem (McKusick, 2004). Hierdie pasiënte toon soortgelyke maar minder ernstige fenotipes as wat voorkom in Zellweger sindroom en pasiënte leef gewoonlik vir ongeveer tien jaar. Kinders met Refsum se siekte is selfs nog matiger beïnvloed

en kan volwassenheid bereik (Gould & Valle, 2000; Gärtner, 2003). Hierdie siektetoestand word deur mutasies in die PEX1 of die PEX2 gene veroorsaak (McKusick, 2004).

Die biochemiese fenotipe van hierdie defekte reflekteer 'n defek in die peroksisoom biogenese. Baielangkettingvetsuur (BLKVS/VLCFA) en fitaansuurvlakke is verhoog, terwyl plasmalogeenvlakke verlaag is. Hoë vlakke van die galsuur intermediêre, di- en trihidroksicholestanoësuur, sowel as pipekoliensuur afkomstig vanaf die lisienmetabolisme kom ook voor (Moser, 1999; Gould, 2001).

2.2.3.2 Rhizomeliese chondrodisplasie punktata

Rhizomeliese chondrodisplasie punktata kan klinies en geneties onderskei word van die Zellwegerspektrum (Gärtner, 2003). Hierdie siektetoestand ontstaan as gevolg van 'n defek in PEX7, die PTS2 reseptor (Gould & Valle, 2000; Gould, 2001; McKusick, 2004). Omdat hierdie reseptor noodsaaklik is vir die invoer van proteïene wat PTS2 bevat, sal 'n defek in hierdie proteïen 'n kliniese fenotipe toon wat verskil van die van die Zellwegerspektrum (Gould, 2001). Rhizomeliese chondrodisplasie punktata word gekenmerk deur unieke skeletabnormaliteite (Gould & Valle, 2000). Dit sluit dismorfiese gesigseienskappe, ernstige verkorting van die proksimale ledemate en kalsifisering van die kraakbeen in (Gould, 2001; Gärtner, 2003). Ander simptome sluit katarakte en abnormale psigomotoriese ontwikkeling in. Pasiënte word selde ouer as twee jaar (Gould, 2001). Daar bestaan ook 'n wye fenotipiese spektrum vir hierdie siektetoestand, insluitende baie matige variante waar rhisomelie nie voorkom nie (Gärtner, 2003).

Die biochemiese fenotipe reflekteer ook die molekulêre basis van die siektetoestand. Pasiënte het defektiewe vertakketting vetsuurmetabolisme en 'n defek in die plasmalogeenbiosintese. Die ander biochemiese defekte van die Zellwegerspektrum kom nie voor nie (Gould, 2001).

2.2.3.3 Behandeling

Klinies is die PBD 'n groep siektetoestande wat die dood veroorsaak. Behandeling skep 'n probleem omdat daar veral in Zellweger sindroom reeds by geboorte betekenisvolle neokortikale veranderinge in die brein is. Volkome herstel is dus onmoontlik. Behandeling word daarom hoofsaaklik gerig op ondersteunende hulp en die behandeling van die simptome. In die matiger variante kan pasiënte behandel word deur farmakologiese induksie van peroksisome (McGuinness *et al*, 2000), dokosaheksaenoësuur suplementasie en (Suzuki *et al*, 1996) hepatosietoorplantings (Sokal *et al*, 2003).

2.3 Peroksisomale α -oksidasie van fitaansuur

2.3.1 Inleiding

Fitaansuur (3,7,11,15-tetrametielheksadekanoësuur) is afkomstig vanaf fitol, die syketting van chlorofil (Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003). Mikroörganismes teenwoordig in die gastro-intestinale sisteem van soogdiere stel fitol effektief vry vanaf chlorofil, waarna die fitol omgeskakel word na fitaansuur. Die absorpsie van chlorofil in die menslike verteringstelsel is minimaal (Verhoeven & Jakobs, 2001) maar vrye fitol wat ingeneem word, word maklik geabsorbeer en omgeskakel na fitaansuur (Baxter, 1968). 'n Normale dieet bevat ongeveer 50 - 100 mg fitaansuur per dag (Verhoeven & Jakobs, 2001).

Die meganisme van fitaansuurafbraak was vir baie lank onbekend (Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003). 'n α -Oksidasie sisteem vir die afbraak van vertaktekettingvetsure is eers in 1966 gerapporteer (Mukherji *et al*, 2003). Die belangstelling in die meganisme van vetsuur α -oksidasie het toegeneem nadat PBD en enkel-ensiemdefekte ontdek is. Dit sluit Refsum se siekte in, waartydens fitaansuur akkumuleer (Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003).

Die β /3-metielgroep in die fitaansuurmolekule voorkom afbraak deur die β -oksidasie sisteem (Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003) omdat 'n 3-ketoasiel-KoA intermediêr nie kan vorm nie (Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003). α - en ω -Oksidasie is die enigste twee weë waarlangs hierdie

vetsure gemetaboliseer kan word. Alhoewel fitaansuur ω -oksidasie ondergaan, vind dit teen 'n baie stadige tempo plaas (Wanders *et al*, 2003). Fitaansuur ondergaan een siklus α -oksidasie, (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2003) om pristaansuur (2,6,10,14-tetrametielpentadekanoësuur) te vorm, 'n 2-metiel vetsuur wat β -oksidasie kan ondergaan (Wanders *et al*, 2003).

2.3.2 Volledige oksidasie van fitaansuur

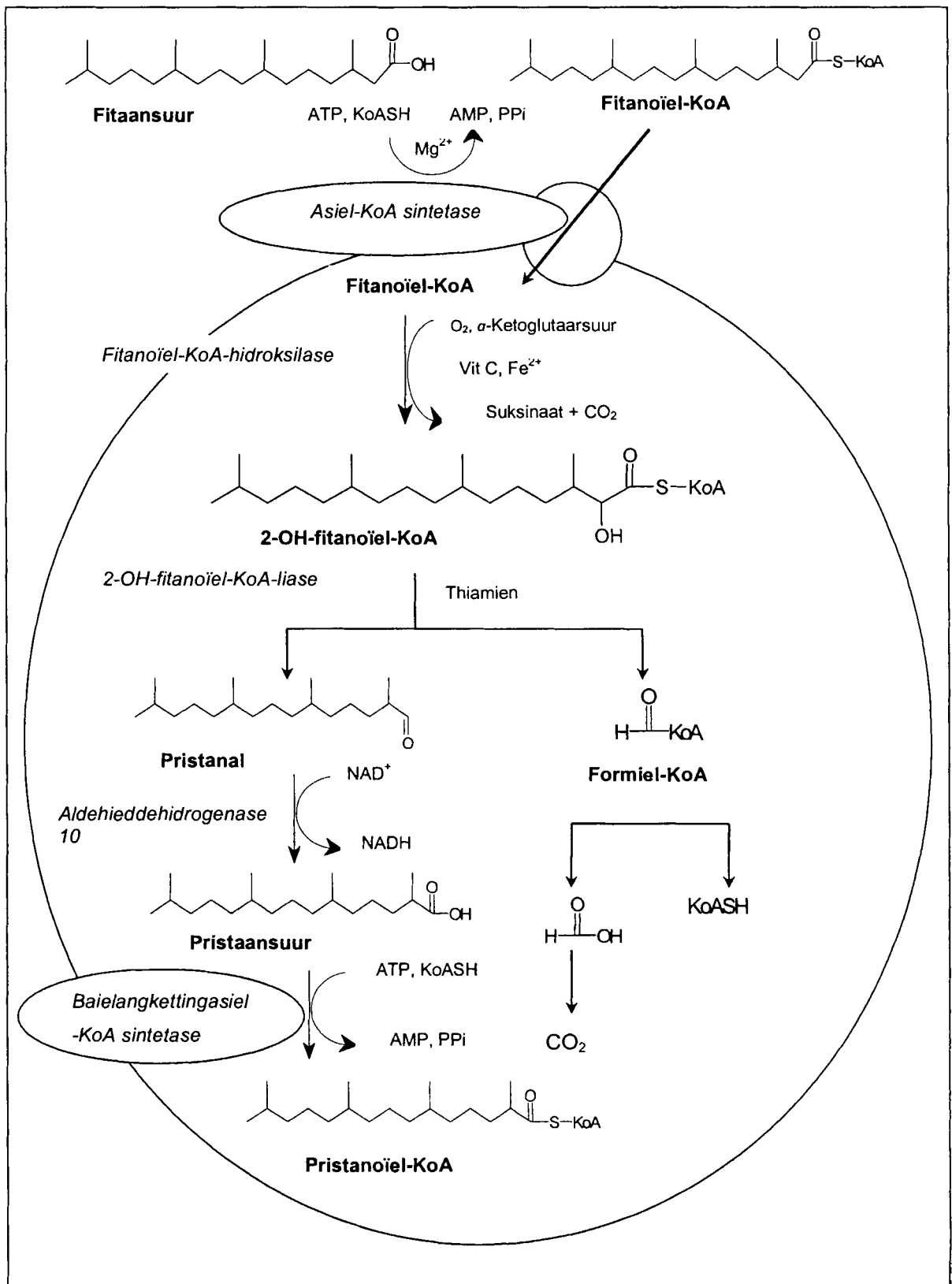
Die eerste stap van fitaansuuroksidasie is aktivering van fitaansuur om fitanoïel-KoA te vorm (Figuur 3) (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003). Hierdie reaksie word gekataliseer deur langkettingasiel-KoA sintetase (EC 6.2.1.3) (Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003) aan die sitoplasmiese kant van die peroksisoommembraan (Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003). Die reaksie benodig Ko-ensiem A (KoA), Adenosientrifosfaat (ATP) en Magnesium (Mg^{2+}) (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001).

Fitanoïel-KoA dring die peroksisoom binne deur 'n onbekende meganisme. Daar is moontlik 'n membraanproteïen verantwoordelik vir aktiewe transport (Verhoeven & Jakobs, 2001). Sodra fitanoïel-KoA die matriks van die peroksisoom bereik, word dit omgeskakel na 2-hidroksi-fitanoïel-KoA deur die ensiem fitanoïel-KoA-hidroksilase (PhyH) (EC 1.14.11.18) (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003). Hierdie reaksie is ten volle afhanklik van α -ketoglutaarsuur en Fe^{2+} (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003) en tot 'n mindere mate van Vitamien C (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2003). Fitanoïel-KoA-hidroksilase benodig ook ATP of GTP, maar toon hoër aktiwiteit in die teenwoordigheid van GTP (Wanders *et al*, 2003). Suksiensuur word tydens hierdie reaksie as byproduk gevorm (Figuur 3) (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003).

Die derde stap in die oksidasie van fitaansuur is 'n splytingsstap wat uitgevoer word deur 2-hidroksi-fitanoïel-KoA-liase (2HPCL). Hierdie reaksie benodig tiamien (Van Veldhoven *et al*, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*,

2003) en Mg^{2+} (Mukherji *et al*, 2003) as kofaktor. Die produkte van hierdie reaksie is pristanal en formiel-KoA. Formiel-KoA word vinnig gehidroliseer na metanoeësuur en KoA (Figuur 3). Metanoeësuur kan verder gemetaboliseer word na CO_2 in die sitosol (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003).

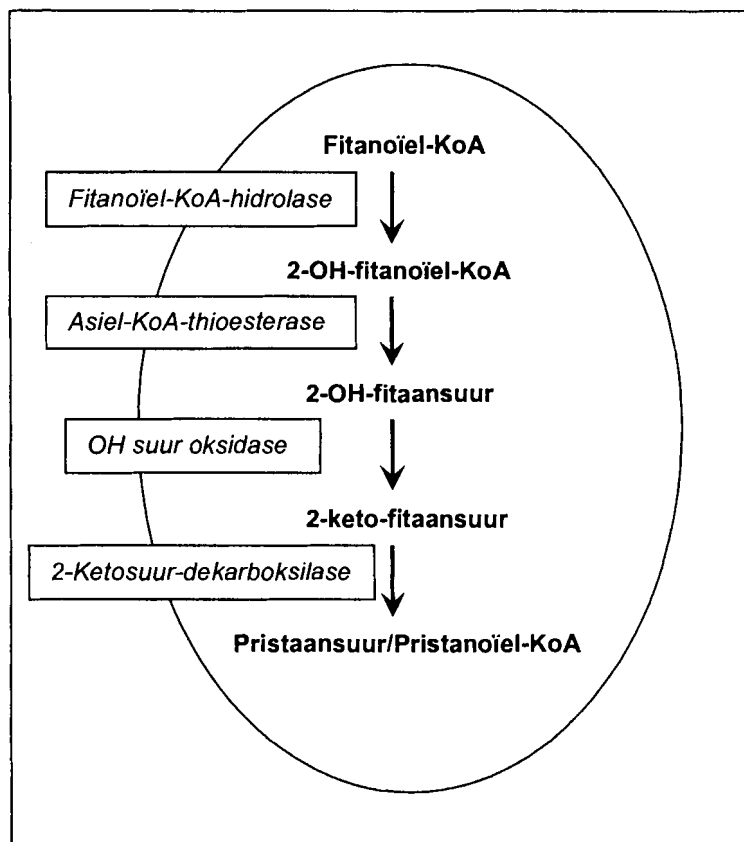
Die vierde stap is die oksidasie van pristanal na pristaansuur (Figuur 3) (Van Veldhoven *et al*, 2001; Verhoeven & Jakobs, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003). Die ensiem vir hierdie reaksie is die nikotienamieddinukleotied (NAD)⁺-afhanklike aldehydedehidrogenase 10 (ALDH10) (EC 1.2.1.3) (Van Veldhoven *et al*, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003). Hierdie weg kan beide die stereo-isomere van fitaansuur as substraat gebruik (Wierzbicki *et al*, 2002).



Figuur 3: Fitaansuur α -oksidatie (Verhoeven & Jacobs, 2001).

2.3.2.1 Alternatiewe weg vir die α -oksidasie van fitaansuur

Peroksisome is nie net in staat om die KoA-ester van 2-hidroksi-fitaansuur deur 2-hidroksi-fitanoïel-KoA liase te metaboliseer nie, maar ook die vrye vetsuur self. Vrye 2-hidroksi-fitaansuur kan gevorm word in die peroksisome deur splyting van 2-hidroksi-fitanoïel-KoA. Hierdie reaksie word gekataliseer deur 'n asiel-KoA-thioesterase (Wanders *et al*, 2003). Peroksisome bevat 2-hidroksi-fitaansuur oksidase (EC 1.1.3.27) aktiwiteit wat 2-hidroksi-fitaansuur produseer (Figuur 4). Die aard van die oksidase betrokke is nog onbekend. Dit is ook nie duidelik of hierdie alternatiewe weg 'n belangrike rol *in vivo* speel nie. Die feit dat metanoeësuur die dominante produk van fitaansuur α -oksidasie is, ondersteun die aanname dat die 2-hidroksi-fitanoïel-KoA na pristanal die pristaansuurweg domineer (Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003).



Figuur 4: Alternatiewe weg vir fitaansuur α -oksidasie (Wanders *et al*, 2003).

2.3.3 *Ensiemdefekte in die peroksisomale α -oksidase sisteem*

2.3.3.1 Refsum se siekte

Refsum se siekte word veroorsaak deur 'n mutasie in die geen wat kodeer vir fitanoïel-KoA-hidroksilase (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003; McKusick, 2004). Die kliniese simptome sluit retinitis pigmentosa, perifere neuropatie, serebellêre ataksie, anosmie, hoë konsentrasies proteïne in die serebrospinale vloeistof, kardiomiopatie, droë vel, skeletabnormaliteite van die hande en voete en sensori-neurale doofheid in (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002). Psigiatrisie versteurings en proteïenurie is seldsame kliniese simptome wat al waargeneem is (Wierzbicki *et al*, 2002).

Hierdie siektetoestand manifesteer van vroeg in die kinderjare tot met die sesde dekade, maar in die meeste pasiënte manifesteer dit in die tienerjare of vroeë volwassenheid (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002). Die verloop van die siekte is geleidelik en word dikwels onderbreek deur onverklaarbare periodes van beterskap (Verhoeven & Jakobs, 2001).

Die biochemiese kenmerk van Refsum se siekte is 'n akkumulasie van fitaansuur in die bloed en weefsel . Die konsentrasie van fitaansuur in die plasma kan tot so hoog as 1300 $\mu\text{mol/l}$ (kontrole < 10 $\mu\text{mol/l}$) styg, maar > 200 $\mu\text{mol/l}$ is patologies. Die pristaansuurkonsentrasie is normaal of verlaag en 2-hidroksi-fitaansuur ('n bekende metaboliet van fitaansuur) is afwesig (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003).

2.3.3.2 Behandeling

Refsum se siekte word simptome behandel deur die fitaansuurinname te beperk of dit uit die plasma te verwyder. Behandeling klaar gewoonlik die simptome van 'n droë vel, sensoriese neuropatie en ataksie op. Die effektiwiteit van behandeling op die verloop van retinitis pigmentosa, anosmie en doofheid is egter onduidelik (Wierzbicki *et al*, 2002).

2.4 β -oksidasie van pristaansuur en baie-langkettingvetsure in die peroksisome

2.4.1 Inleiding

Die vermoë van peroksisome om vetsuur β -oksidasie te kataliseer, is in 1976 bevestig (Wanders *et al*, 1990). Daar is ook aangetoon dat dit verloop deur dieselfde meganisme as in die mitochondria. Dit impliseer vier opeenvolgende stappe: (1) dehidrogenasie, (2) hidratisie, (3) dehidrogenasie en, (4) tiolitiese splyting (Wanders *et al*, 2001).

Die peroksisomale sisteem is nie net 'n funksionele duplikaat van die mitochondriale sisteem nie, maar is ook betrokke in die β -oksidatiewe kettingverkorting van 'n spesifieke groep verbindings. Die herkenning van 'n aantal oorgeërfde siektetoestande in mense, wat veroorsaak word deur 'n defek in die peroksisomale β -oksidasiesisteem, beklemtoon die belang van hierdie sisteem (Wanders *et al*, 1990).

Die substrate wat deur die β -oksidasie sisteem hanteer word, sluit pristaansuur, die C₂₇ galsuur intermediêre - dihidroksicholestanoësuur (DHCA) en trihidroksicholestanoësuur (THCA), baie-langkettingvetsure (BLKVS/VLCFA), dikarboksielsure, prostaglandiene, leukotriene en sekere xenobiotiese stowwe in (Wanders *et al*, 1990; Clayton, 2001; Van Veldhoven *et al*, 2001).

2.4.2 β -oksidasie van pristaansuur in die peroksisome

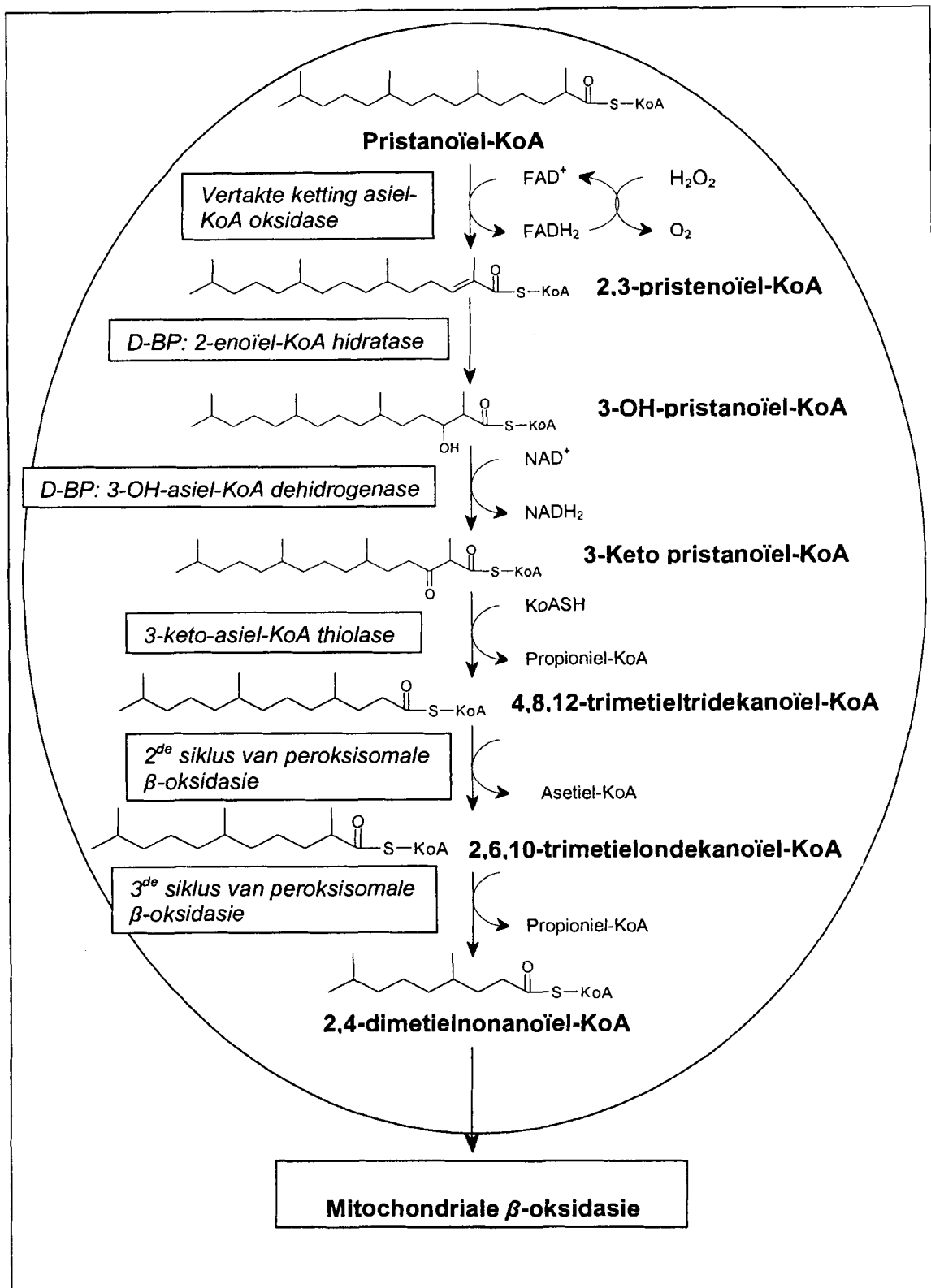
Pristaansuur is afkomstig vanaf die dieet en die produksie vanaf fitaansuur deur α -oksidasie (Verhoeven & Jakobs, 2001). Baie-langkettingasiel-KoA sintetase (EC 6.2.1.3) gelokaliseer in beide die peroksisome en die endoplasmiese retikulum het hoë affiniteit vir reguit- en vertaktekettingvetsure, insluitende pristaansuur. Hierdie ensiem speel 'n rol in die intraperoksisomale aktivering van pristaansuur na pristanoïel-KoA (Figuur 3) (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2003). Mg²⁺ en ATP is noodsaaklik vir hierdie stap (Mukherji *et al*, 2003). Pristaansuur afkomstig vanaf die dieet word omgeskakel na pristanoïel-KoA deur 'n langkettingasiel-KoA sintetase, wat gerig is na die sitosol (Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003).

Die omskakeling van pristaansuur na pristanoïel-KoA gee oorsprong aan 'n mengsel van (2R, S)-pristanoïel-KoA epimere (Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003). Aangesien net die stereo-isomeer, wat die 2-metiel groep in die S-konfigurasie bevat β -oksidasie kan ondergaan, moet 2R-pristanoïel-KoA 'n rasemase stap ondergaan voordat dit verder afgebreek kan word (Verhoeven & Jakobs, 2001). Hierdie omskakeling van die (2R)-epimeer na die (2S)-epimeer word gekataliseer deur α -metielasiel-KoA rasemase (EC 5.1.99.74) (Wierzbicki *et al*, 2002; Mukherji *et al*, 2003), wat geen kofaktore of ko-substrate nodig het nie (Mukherji *et al*, 2003). Hierdie reaksie brug dus die peroksisomale α - en β -oksidasie sisteme (Mukherji *et al*, 2003).

Die eerste stap in β -oksidasie is om pristanoïel-KoA om te skakel na 2,3-pristenoïel-KoA. Hierdie reaksie word gekataliseer deur die vertaktekettingasiel-KoA oksidase wat FAD⁺ afhanklik is. Tydens hierdie stap word molekulêre suurstof gereduseer tot waterstofperoksied wat vinnig deur katalase afgebreek word (Figuur 5) (Verhoeven & Jakobs, 2001). Die volgende twee stappe word gekataliseer deur 'n multifunksionele proteïen, D-Bifunksionele proteïen. Die proteïen bevat beide 2-enoïel-KoA hidratase (EC 4.2.1.17) en 3-hidroksi-asiel-KoA dehidrogenase (EC 1.1.1.35) aktiwiteit (Figuur 5). Die laaste stap is tiolitiese splyting van die substraat, wat gekataliseer word deur 3-ketoasiel-KoA thiolase (EC 2.3.1.16) (Figuur 5). Die produk na een siklus van peroksisomale β -oksidasie van pristaansuur is 4,8,12-trimetielsekanoïel-KoA wat verder peroksisomale β -oksidasie kan ondergaan. Dit is egter nog onseker of dieselfde ensieme by verdere β -oksidasie betrokke is (Verhoeven & Jakobs, 2001).

Die produk van die tweede siklus is 'n 2R-metiel-vertakte ketting asiel-KoA, 2,6,10-trimetielsekanoïel-KoA. Voordat hierdie intermediêr afgebreek kan word, moet dit omgeskakel word na die 2S stereo-isomeer deur α -metiel-KoA rasemase (Verhoeven & Jakobs, 2001).

In die peroksisoom kan pristanoïel-KoA drie siklusse van β -oksidasie ondergaan om 4,8-dimetielsekanoïel-KoA en propioniel-KoA en asetiel-KoA eenhede te vorm. 4,8-Dimetielsekanoïel-KoA kan omgeskakel word na sy karnitienester in die peroksisoom deur middel van karnitienoktanoïeltransferase (COT) waarna dit na die mitochondria vervoer word (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2003).



Figuur 5: β -oksidasie van pristaansuur (Verhoeven & Jacobs, 2001).

In opeenvolgende siklusse van β -oksidasie word propioniel-KoA en asetiel-KoA om die beurt vrygestel. Propioniel-KoA word omgeskakel na propionielkarnities in die peroksisoommatriks, waarna dit getranspoteer word na die mitochondria waar dit geoksideer word na CO_2 (Verhoeven & Jakobs, 2001; Mukherji *et al*, 2003; Wanders *et al*, 2003). Die eindbestemming van die asetiel-KoA eenhede is nie bekend nie, maar kan moontlik gebruik word vir vetsuurbiosintese of dit kan die mitochondria binnedring as asetielkarnities (Verhoeven & Jakobs, 2001).

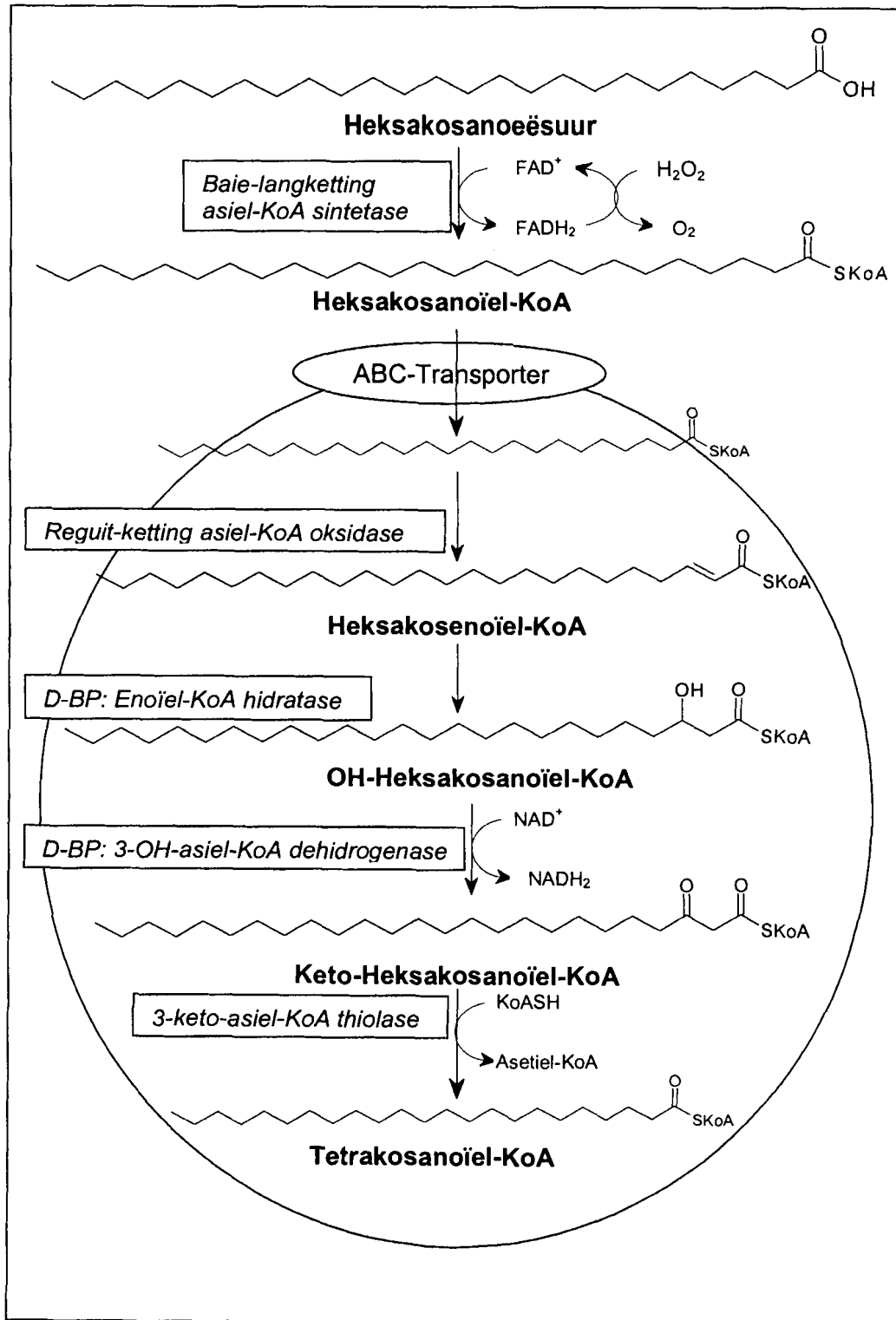
Peroksisomale thioesterases kan die verskillende KoAesters hidroliseer om vrye sure te produseer wat dan na die mitochondria getranspoteer word, waar dit geaktiveer en gedegradeer word na CO_2 en water (Wanders *et al*, 2003).

2.4.3 β -oksidasie van baie-langkettingvetsure in die peroksisome

Daar is aanvanklik gedink dat die peroksisomale β -oksidasie sisteem slegs 'n helpende rol speel wat die mitochondriale sisteem ondersteun in tye van verhoogde vetsuurverskaffing. In 1982 is bevind dat sekere baie-langkettingvetsure (BLKVS/VLCFA), insluitende C24:0 en veral C26:0 akkumuleer in die bloed en weefsel van pasiënte met peroksisomale defekte, met normale vlakke langkettingvetsure wat suggereer dat die peroksisome die primêre plek vir baielangkettingvetsuuroksidasie is (Wanders & Tager, 1998).

Tydens peroksisomale β -oksidasie van die BLKVS/VLCFA is die volgende ensieme betrokke: (1) peroksisomale baielangkettingasiel-KoA sintetase, (2) reguitkettingasiel-KoA oksidase, (3) bifunksioneleproteïen met enoïel-KoA hidratase en 3-hidroksi-asiel-KoA dehidrogenase aktiwiteit en (4) 3-ketothiolase (Wanders *et al*, 1996).

Voordat peroksisomale β -oksidasie kan plaasvind, moet die vetsure geaktiveer word tot hulle korresponderende KoAesters (Wanders *et al*, 1990; Clayton, 2001; Gould, 2001). Dit vind plaas naby aan die peroksisoommembraan (Van Veldhoven *et al*, 2001) deur middel van die langkettingasiel-KoA sintetase ensiem (EC 6.2.1.3) (Dubois-Dalcq *et al*, 1999; Gould, 2001). Hierdie ensiem vereis ATP, Mg^{2+} en KoASH vir normale funksie (Gould, 2001).



Figuur 6: β -oksidatie van heksakosanoësuur (Wanders *et al*, 1996).

Daar is reeds vier ATP-bindingskasset (ABC) transporters in die peroksisoommembraan geïdentifiseer. Die ABC-transporters is lede van die superfamilie van membraanproteïene wat betrokke is in die transport van verskeie verbindings oor membrane. Hierdie transporters kan volledige- of halftransporters wees wat homo- of heterodimeriseer om die aktiewe transporter te vorm. In die geval van die peroksisomale transporters is almal halftransporters (Baerends *et al*, 2000). Die gemuteerde geen in adrenoleukodistrofie pasiënte is geïdentifiseer en kodeer vir een van hierdie ABC-transporters wat baielangkettingasiel-KoA's tot in die peroksisoom vervoer (Dubois-Dalcq *et al*, 1999).

Behalwe vir die eerste stap word die β -oksidase van BLKVS/VLCFA gedeeltelik gekataliseer deur dieselfde ensieme as vir die β -oksidase van pristaansuur (Wanders *et al*, 1996). Hierdie eerste stap word gekataliseer deur die reguitketting asiel-KoA oksidase (EC 1.3.3.6) (Wanders *et al*, 2001). Die ensiem is 'n flavoensiem wat verantwoordelik is vir die vorming van 'n dubbelbinding tussen die α en β koolstofatome van die asiel-KoA en gee elektrone oor aan suurstof. Dit produseer waterstofperoksied as 'n byproduk (Wanders *et al*, 1990; Clayton, 2001; Gould, 2001). Asiel-KoA oksidase kataboliseer nie kortkettingasiel-KoA esters byvoorbeeld buteriel-KoA en heksanoïel-KoA nie, met die gevolg dat asiel-KoA esters nie volledig geoksideer word nie, maar slegs kettingverkorting ondergaan (Wanders *et al*, 1990; Clayton, 2001; Wanders *et al*, 2001).

Die volgende twee reaksies in peroksisomale β -oksidase word gekataliseer deur die D-bifunksioneleproteïene wat beide enoïel-KoA hidratase en 3-hidroksi-asiel-KoA dehidrogenase aktiwiteit bevat (EC4.2.1.17; EC1.1.1.35) (Wanders *et al*, 1990; Clayton, 2001; Wanders *et al*, 2001). Die enoïel-KoA-hidratase voeg water by oor die dubbelbinding van die enoïel-KoA en produseer 'n hidroksi-asiel-KoA wat dan geoksideer word na 'n ketoasiel-KoA. Die waterstof word oorgedra na NAD^+ (Gould, 2001).

Die laaste reaksie word gekataliseer deur peroksisomale 3-ketoasiel-KoA-thiolase (EC2.3.1.16) (Wanders *et al*, 1990; Clayton, 2001), wat die ketoasiel-KoA splyt na asetiel-KoA en 'n asiel-KoA wat verkort is met twee koolstofatome (Gould, 2001).

Die KoA-esters wat vorm tydens β -oksidase word moontlik omgeskakel na die korresponderende karnitienesters deur middel van karnitienasieltransferase (CAT) en/of karnitienoktanoïeltransferase (COT). Hierdie karnitienesters word dan na die

sitosol vervoer en opgeneem in die mitochondria deur karnitien/asielkarnitientranslokase (CACT), sodat verdere β -oksidasie kan plaasvind. Alternatiewelik, kan buterieel-KoA en/of heksanoïel-KoA ook splyting ondergaan deur middel van een van die asiel-KoA thioesterases, om vrye vetsure te vorm. Hierdie vrye vetsure word ook na die mitochondria vervoer, waar dit geaktiveer word deur mitochondriale kortkettingasiel-KoA sintetases sodat volledige oksidasie kan plaasvind (Wanders *et al*, 2001).

2.4.4 'n Vergelyking tussen mitochondriale en peroksisomale vetsuur β -oksidasie

Die peroksisomale- en mitochondriale β -oksidasie sisteme verskil in baie opsigte van mekaar en vervul verskillende rolle in vetsuuroksidasie (Wanders *et al*, 2001).

2.4.4.1 Volledige oksidasie van vetsure in die mitochondria vs. kettingverkorting in die peroksisome

Peroksisomale β -oksidasie verkort BLKVS/VLCFA wat swak geoksideer word deur die mitochondriale sisteem (Osmundsen *et al*, 1991). Peroksisome het nie 'n Krebs-siklus nie en daarom kan die asietiel-KoA eenhede nie na CO_2 en water afgebreek word nie (Wanders *et al*, 2001). Dit is nog nie bekend hoeveel siklusse β -oksidasie in die peroksisome plaasvind nie, maar in beginsel gaan β -oksidasie voort tot buterieel-KoA. β -oksidasie stop dan omdat die twee asiel-KoA oksidasies in peroksisome nie buterieel-KoA as substraat herken nie (Wanders & Tager, 1998, Wanders *et al*, 2001). Die hoof funksie van mitochondriale β -oksidasie is om asietiel-KoA groepe te genereer (Osmundsen *et al*, 1991).

2.4.4.2 Die produksie van ATP

Die eerste stap in die mitochondria vind deur verskeie asiel-KoA dehidrogenases, waarvan almal flavien-adenien-dinukleotied (FAD) gebonde is, plaas. Elektrone word geskenk aan die respiratoriese ketting op die vlak van ko-ensiem Q. In teenstelling hiermee, sal die peroksisomale oksidasies, wat ook flavoproteïene is, hulle elektrone direk aan molekulêre suurstof skenk om waterstofperoksied te produseer, wat dan omgeskakel word na suurstof en water deur middel van katalase. Dus een siklus β -

oksidasie in die peroksisome is slegs die helfte so effektief om ATP te produseer as tydens mitochondriale β -oksidasie (Wanders & Tager, 1998, Wanders *et al*, 2001).

2.4.4.3 Die rol van karnitien

Karnitien speel 'n sleutelrol in beide mitochondriale en peroksisomale β -oksidasie, maar op verskillende vlakke. Dit is betrokke in die opname van langkettingvetsure in die mitochondriale matriks deur middel van karnitienpalmitoïeltransferase I (CPT I), die karnitien/asielkarnitientranslokase (CACT) en karnitienpalmitoïeltransferase II (CPT II). In die peroksisome speel karnitien nie 'n rol in die opname van vetsure nie, maar wel in die uitvoer van kortkettingvetsure wat gevorm word tydens β -oksidasie van BLKVS/VLCFA. Dit word dan vervoer na die mitochondria as karnitienesters (Wanders *et al*, 2001).

2.4.4.4 Regulering van mitochondriale en peroksisomale β -oksidasie

Die korttermynregulering van mitochondriale β -oksidasie berus op die maloniel-KoA vlakke wat 'n kragtige inhibeerder van CPT I is. Daarom sal veranderinge in die konsentrasie van maloniel-KoA, byvoorbeeld tydens voeding of vasting, die aktiwiteit van CPT I beïnvloed. Dit bepaal die tempo van mitochondriale vetsuuroksidasie (Wanders & Tager, 1998; Wanders *et al*, 2001). Aanhoudende peroksisomale β -oksidasie is afhanklik van die beskikbaarheid van asiel-KoA's, NAD^+ , NADPH (nikotienamiedadeniendinukleotiedfosfaat), vrye KoA en die uitvoer van asietielgroepe (Hettema & Tabak, 2000). Ten spyte van hierdie verskille in die korttermynregulering, deel die langtermynregulering van beide sisteme sommige eienskappe omdat beide geïnduseer word deur dieselfde verbindings. Die enigste verskil is die mate van induksie (Wanders *et al*, 2001).

2.4.4.5 Substraatspesifisiteit van die peroksisomale- en mitochondriale β -oksidasie sisteem

Vanuit 'n fisiologiese oogpunt is die belangrikste verskil die verskillende substraatspesifisiteite. Die meerderheid langkettingvetsure word in die mitochondria geoksideer en nie in die peroksisome nie. Sommige vetsure kan egter nie deur die mitochondria hanteer word nie en is ten volle afhanklik van die peroksisome vir β -

oksidasie. Hierdie vetsure sluit in: die BLKVS/VLCFA, pristaansuur, dihidroksicholestanoeësuur, trihidroksicholestanoeësuur en die eikosanoïede (Wanders & Tager, 1998; Wanders *et al*, 2001).

2.4.5 Ensiemdefekte van peroksisomale vetsuur β -oksidasie

Daar bestaan verskeie genetiese siektetoestande waarin peroksisomale β -oksidasie versteur is. Dit word biochemies waargeneem as die akkumulasie van BLKVS/VLCFA, pristaansuur en di- en trihidroksicholestanoeësuur in die plasma van pasiënte (Wanders & Tager, 1998).

Defekte van die peroksisomale β -oksidasie sluit in: (1) siektetoestande waarin peroksisomale β -oksidasie versteur is as gevolg van 'n defek van alle peroksisomale β -oksidasie ensiemproteïene, (2) as gevolg van die afwesigheid van peroksisome in peroksisoombiogenese defekte, (3) siektetoestande waarin peroksisomale β -oksidasie versteur is as gevolg van die verlies van veelvuldige β -oksidasie ensiem aktiwiteite en (4) siektetoestande waarin 'n enkele peroksisomale β -oksidasie ensiemaktiwiteit nie teenwoordig is nie (Wanders *et al*, 1990). Die volgende defekte van peroksisomale vetsuur β -oksidasie is al geïdentifiseer:

2.4.5.1 X-gekoppelde adrenoleukodistrofie (X-ALD)

Adrenoleukodistrofie is 'n X-gekoppelde versteuring wat ontstaan as gevolg van 'n mutasie in die ABCD1 geen wat kodeer vir 'n ATPase bindingskassetproteïene. Dit lei tot 'n defek in die peroksisomale β -oksidasie met gevolglike akkumulasie van BLKVS/VLCFA in die bloed en weefsel van hierdie pasiënte. Hierdie siektetoestand manifesteer primêr in die adrenale korteks, die miëlienskede van die sentralesenuweestelsel en die Leydigsele van die testis (McKusick, 2004).

Daar is sewe fenotipes wat insluit die serebellêre vorm in kinders, Adrenomeïeloneuropatie (AMN), serebellêre adrenoleukodistrofie in adolessente, serebellêre adrenoleukodistrofie in volwassenes en adolessente en Addison se siekte sonder neurologiese betrokkenheid (Wanders *et al*, 2001; McKusick, 2004). Die klassifikasie van die verskillende fenotipes word gebaseer op die ouderdom

waarop die simptome begin en die organe wat primêr beïnvloed word (Wanders & Tager, 1998). Die kliniese manifestering kan selfs in dieselfde familie varieer (Wanders *et al*, 2001; McKusick, 2004).

2.4.5.2 Asiel-KoA oksidase

'n Defek van die reguitkettingasiel-KoA oksidase is tot dusver slegs in 'n paar pasiënte beskryf. Almal het ernstige neurologiese afwykings insluitende epilepsie, hipotonie, gehoordefekte en sigdefekte as gevolg van retinopatie. In hierdie pasiënte is β -oksidase defektief as gevolg van die defektiewe aktiwiteit van asiel-KoA oksidase. Dit verklaar die verhoogde vlakke BLKVS/VLCFA in die plasma en weefsel van hierdie pasiënte. In ooreenstemming met die rol van reguitkettingasiel-KoA oksidase in peroksisomale β -oksidase, is die pristaansuur, DHCA en THCA vlakke normaal (Wanders & Tager, 1998; Wanders *et al*, 2001). Daar is tot dusver geen defekte van die vertaktekettingasiel-KoA oksidase beskryf nie.

2.4.5.3 D-Bifunksionele proteïen (D-BP)

'n Defek van die D-Bifunksionele proteïen word veroorsaak deur 'n mutasie in die HSD17B4 geen (McKusick, 2004). Die kliniese manifestering is ernstig en stem in baie opsigte ooreen met dié van Zellweger sindroom. Abnormaliteite sluit in neonatale hipotonie, gesigsabnormaliteite, epilepsie, ontwikkelingsvertraging en vroeë dood in byna al die pasiënte. In die meeste gevalle is neuronale migrasie ook versteur soortgelyk aan Zellweger sindroom. Daar is onlangs bevind dat D-Bifunksionele proteïendefekte heterogeen is, met drie onderskeie subgroepe: (1) geïsoleerde D-Bifunksionele proteïendefek, (2) enoïel-KoA hidratasedefek en geïsoleerde D-bifunksionele-3-hidroksi-asiel-KoA-dehidrogenase defek (Wanders *et al*, 2001). Pasiënte met D-BP defekte toon verhoogde pristaansuur, THCA en C26:0 vlakke in die plasma (Wanders & Tager, 1998).

2.4.5.4 α -Metielasiel-KoA rasemase

Daar is tot dusver slegs drie pasiënte met α -metielasiel-KoA rasemase defekte beskryf. Die simptome is soortgelyk aan Refsum se siekte in die een geval en adrenomeïelopatie in die ander. Die derde pasiënt was 'n kind sonder neuropatie (Verhoeven & Jakobs, 2001; Wanders *et al*, 2001; McKusick, 2004). Biochemies is daar slegs matige verhoging in fitaansuurkonsentrasies en die BLKVS/VLCFA konsentrasies was binne die normaalgrense (Verhoeven & Jakobs, 2001).

2.4.5.5 Peroksisomale thiolase

Tot dusver is daar slegs een pasiënt met 'n peroksisomale thiolasedefek geïdentifiseer. Die kliniese simptome stem ooreen met dié van Zellweger sindroom. Biochemies is daar 'n verhoging van die galsuur intermediêre en BLKVS/VLCFA. Die fitaansuur- en pristaansuurvlakke van hierdie pasiënt is ongelukkig nie gerapporteer nie (Verhoeven & Jakobs, 2001).

2.4.4.6 Behandeling

Die behandeling van adrenoleukodistrofie sluit 'n gekombineerde 9-oktadekenoeësuur, baie langkettingbeperkingsdieet, beenmurgoorplantings (McKusick, 2004), statiene en ander 3-HMG-KoA reduktase-inhibeerders in (Pai *et al*, 2000). 'n α -Metielasiel-KoA rasemase defek kan behandel word deur fitaansuur en pristaansuur in die dieet te beperk (Verhoeven & Jakobs, 2001).

2.5 Die ω -oksidase van vetsure

2.5.1 *Die metabolisme ontstaan van dikarboksielsuururie in peroksisomale defekte*

Die ω -oksidase van vetsure is vir die eerste keer in 1934 gerapporteer (Chalmers & Lawson, 1982). ω -oksidase is verantwoordelik vir die detoksifisering van 'n oormaat vetsure tydens oorbelading of versteurde mitochondriale β -oksidase. Tydens ω -

oksidasie word dikarboksielsure gevorm, wat in die geval van defektiewe β -oksidasie, nie verder gemetaboliseer kan word nie. Dikarboksielsure word dan in die uriene uitgeskei (Chalmers & Lawson, 1982; Wanders & Tager, 1998).

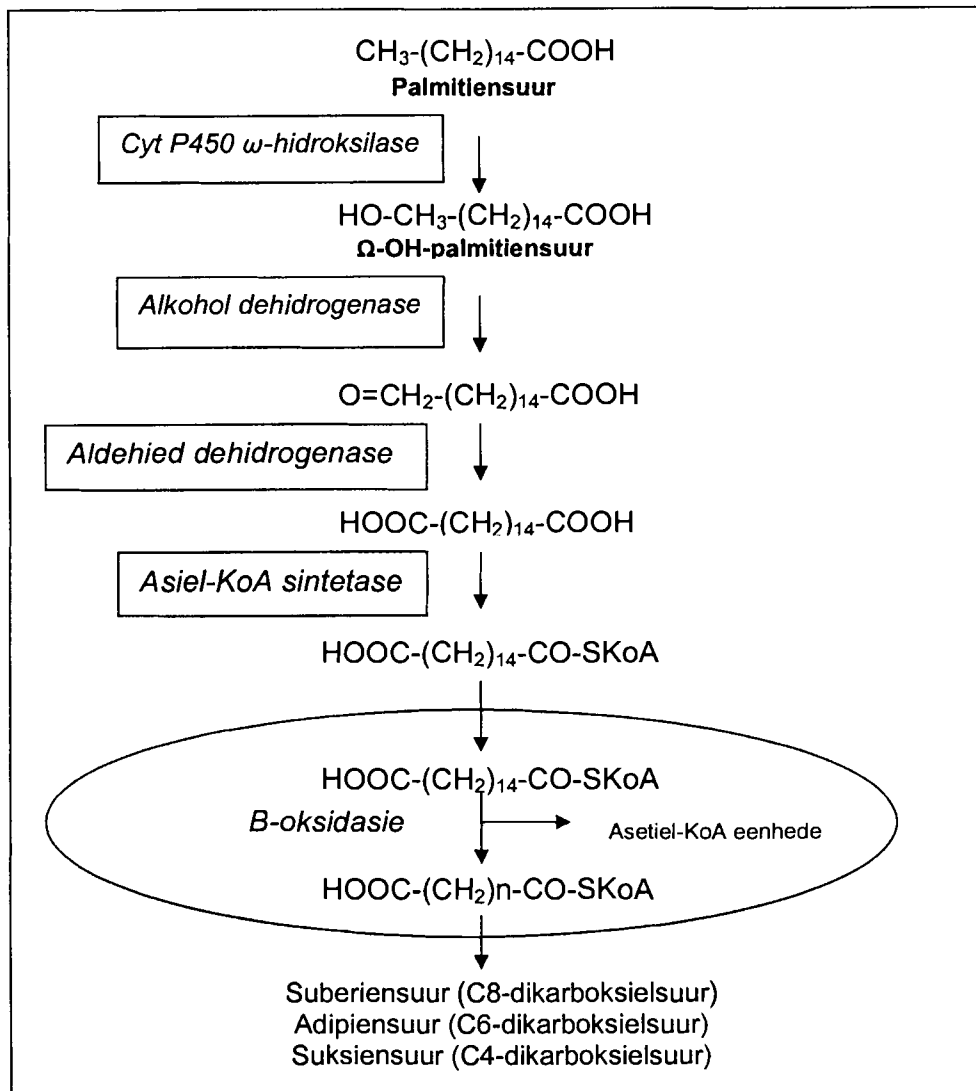
Ω -oksidasie is 'n twee fase proses waartydens vrye vetsure omgeskakel word na ω -hidroksivetsure deur 'n mikrosomale ω -hidroksilase (Chalmers & Lawson, 1982; Wanders & Tager, 1998). Hierdie reaksie benodig suurstof en NADPH (Chalmers & Lawson, 1982). Hierdie ω -hidroksi vetsuur ondergaan dan oksidasie deur middel van twee sitosoliese dehidrogenases, 'n alkoholdehidrogenase (EC 1.1.1.1) en 'n aldehyddehidrogenase (EC 1.2.1.3) om die ooreenstemmende dikarboksielsuur te vorm. Hierdie dikarboksielsuur word dan geaktiveer by die endoplasmiese retikulum om 'n KoA-ester te vorm, waarna dit opgeneem word in die peroksisoom. Die dikarboksiel-KoA-ester ondergaan 'n aantal β -oksidasie siklusse om mediumkettingdikarboksielsure te vorm (Figuur 7) (Wanders & Tager, 1998).

2.5.2 Siftingsmetaboliete vir peroksisomale defekte

Verskeie metaboliete wat in die uriene uitgeskei word, kan gebruik word as merkers vir die sifting van PBD. Hierdie merkers sluit in:

2.5.2.1 Nie-ketotiese dikarboksielsuururie

Die dikarboksielsure wat voorkom, wissel van adipiensuur (C6) tot heksadekanedioësuur (C16). Dit kan verder onderverdeel word in twee groepe: (1) die dikarboksielsure met 'n ewe getal koolstofatome in die ketting met 'n mediumkettinglengte soos adipiensuur, suberiensuur en sebasiensuur en 'n langketting soos heksadekanedioësuur en (2) die dikarboksielsure met 'n onewe getal koolstofatome in die ketting met 'n mediumkettinglengte soos pimeliesesuur en azelaïsesuur en 'n langketting soos undekanedioësuur, tridekanedioësuur en pentadekanedioësuur (Rocchiccioli *et al*, 1986; Niwa, 1995). Die dikarboksielsure met die hoogste diagnostiese spesifisiteit en sensitiwiteit vir nie-ketotiese dikarboksielsuururie is adipiensuur, suberiensuur en sebasiensuur (Niwa, 1995).



Figuur 7: ω -oksidasie van bv. palmitiensuur (Wanders & Tager, 1998).

Nie-ketotiese dikarboksielsuururie toon aan dat die mitchondriale en/of peroksisomale β -oksidasie 'n verlaagde kapasiteit het, wat die beskikbaarheid van vrye vetsure vir β -oksidasie kan verhoog (Rocchiccioli *et al*, 1986; Korman *et al*, 2000; Yamaguchi *et al*, 2001). 'n Defek in die mitchondriale β -oksidasie kan maklik uitgesluit word deur die kliniese beeld in ag te neem (Korman *et al*, 2000).

In PBD word die β -oksidasie van langerkettingdikarboksielsure gedeeltelik geblokkeer en die uitskeiding van langerkettingdikarboksielsure soos sebsiensuur kan meer prominent wees. Daarom verskil die meganisme van dikarboksielsuururie in PBD van dié in mitchondriadefekte (Yamaguchi *et al*, 2001).

Die dikarboksielsure met 'n onewe getal koolstowwe kan ontstaan uit α -hidroksilasie van langkettingvetsure wat akkumuleer in peroksisoomdefekte, gevolg deur die oksidatiewe dekarboksilering na onewe-ketting BLKVS/VLCFA. Mikrosomale ω -oksidasie van hierdie intermediêre sal dan onewe kettinglengtedikarboksielsure produseer wat akkumuleer as gevolg van die versteuring in peroksisomale β -oksidasie (Rocchiccioli *et al*, 1986; Korman *et al*, 2000).

2.5.2.2 Die hidroksi-dikarboksielsure

'n Addisionele eienskap van die dikarboksielsuururie in die PBD is die uitskeiding van die 3-OH-dikarboksielsure en veral 3-hidroksisebasiensuur (C10:0). 3-OH-sebasiensuur en ander 3-OH-dikarboksielsure word ook waargeneem in mitchondriale β -oksidasie defekte en in ketose, maar die uitskeiding van 2-OH-sebasiensuur is veral kenmerkend van peroksisomale defekte. Hierdie metaboliet word gevorm as gevolg van α -hidroksilasie en ω -oksidasie van BLKVS/VLCFA of as gevolg van die α -hidroksilasie van sebasiensuur (Rocchiccioli *et al*, 1986; Niwa, 1995; Korman *et al*, 2000; Yamaguchi *et al*, 2001). Die 2-hidroksi-sebasiensuur kan verder afgebreek word deur oksidatiewe dekarboksilasie, wat lei tot azelaïse- en pimeliese suur (Rocchiccioli *et al*, 1986).

2.5.2.3 Tirosielurie

Tirosielurie word dikwels waargeneem in premature of siek babas. Hierdie toestand is bekend as oorganklike neonatale tirosienemie. Die voorkoms van tirosielurie is andersins 'n teken van lewerwanfunksie (Korman *et al*, 2000; Yamaguchi *et al*, 2001), wat 'n algemene eienskap van peroksisomale defekte is (Korman *et al*, 2000).

2.5.2.4 Epoksidikarboksielsuururie

'n Ander belangrike eienskap van die dikarboksielsuururie is die prominente uitskeiding van 3,6-epoksidikarboksielsure, veral die C₁₄ epoksidikarboksielsuur en die C₁₂ epoksidikarboksielsuur. Hierdie dikarboksielsure het aromatiese strukture en

is afkomstig vanaf mono-onversadigde vetsure. Die gevolglike β -oksidase in pasiënte met algemene peroksisomale defekte is defektief (Korman *et al*, 2000; Yamaguchi *et al*, 2001).

2.5.2.5 Ander organiese sure wat kenmerkend is aan peroksisoomdefekte

Afgesien van die dikarboksielsuururie, is daar ook verhoogde uitskeiding van 2-hidroksi-isovaleriaansuur in die meeste pasiënte. Ander 2-hidroksisure soos 2-hidroksi-glutaarsuur en 2-hidroksi-isokaproësuur, word ook uitgeskei (Korman *et al*, 2000).

2.5.3 Dikarboksielsuururie in ander gevalle

Daar is 'n aantal ander toestande waarin dikarboksielsuururie ook voorkom. Dit sluit in kongenitale laktaatasidose, glikogeenstoringsdefekte tipe I en III, Jamaika vomeringsiekte, valproaatinnname, die innname van mediumkettingtriglisieriede, Rye sindroom, sistemiese karnitiendefekte, glutaarsuururie tipe II, kortketting asiel-KoA dehidrogenase defekte, mediumkettingasiel-KoA-dehidrogenase defekte, langkettingasiel-KoA-dehidrogenase defekte, kortketting-3-hidroksi-asiel-KoA-dehidrogenase defekte, langketting-3-hidroksi-asiel-KoA-dehidrogenase defekte, elektronoordragflavoproteïendefekte, ETF:ubiquinoonoksidoreduktase defekte, karnitienpalmitoëltransferase I en II defekte, karnitientransportdefekte, karnitien/asielkarniteintranslokase defekte en 2,4-dienoël-KoA-reduktase defekte (Niwa, 1995).

2.6 Doelstelling en benaderingswyse

Die voorkoms van individuele metaboliese siektetoestande is slegs 'n klein gedeelte van die ernstige siektetoestande in die pasgebore tydperk, maar as hierdie siektetoestande in geheel beskou word, is metaboliese siektetoestande een van die mees algemene oorsake van siekte in pasgeborenes en beïnvloed dit ongeveer 1 in 2 000 babas (Grayer, 2005). Die gekombineerde voorkoms van peroksisoomdefekte is ongeveer een uit twintigduisend individue in die Verenigde State van Amerika. Die voorkoms van peroksisoomdefekte uit 'n duisend pasiënte met aangebore

metaboliese afwykings tussen 1982 en 1998 by die Necker-Enfants Malades hospitaal in Parys, Frankryk was 2,7 % (Chedrawi & Clark, 2002). Oor die algemeen word daar geskat dat peroksisomale defekte 1 in 50 000 tot 1 in 100 000 geboortes beïnvloed (Grayer, 2005). In Suid-Afrika bestaan tans geen fasiliteite vir die diagnose van peroksisomale defekte nie. Geen behandeling bestaan tans vir die defekte nie, wat die belang van genetiese raadgewing en voorkoming beklemtoon. In hierdie studie word beoog om 'n tegniek te implementeer en te standaardiseer vir die Suid-Afrikaanse populasie, sodat hierdie siektetoestande plaaslik gediagnoseer kan word.

'n Vinnige sensitiewe metode vir die analisering van baie-langkettingvetsure, fitaansuur en pristaansuur word vereis vir die opsporing van moontlik geaffekteerde pasiënte. Gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS) met stabiele isotope van elk van die betrokke metaboliete as interne standaarde is die standaardmetode wat gebruik word (Vreken *et al*, 1998). Hierdie metode sal in hierdie studie aangewend word. Dit is egter belangrik om die normaalgrense vir die Suid-Afrikaanse populasie te bepaal.

Geen siftingstoetse bestaan vir die opsporing van hierdie defekte nie en tans word seleksie slegs op grond van die kliniese beeld uitgevoer. Die gebrek aan 'n eenvoudige siftingstoets vir peroksisomale defekte dra daartoe by dat baie defekte in die metabolisme nie gediagnoseer word nie. Veral in Suid-Afrika waar defekte en die kliniese beeld wat daarmee gepaard gaan, nie altyd bekend is nie, kan dié defekte ongediagnoseerd bly. Bepaling van baie-langkettingvetsure in serum is tans die aanbevole eerste toets vir diagnostisering van pasiënte met verwagte peroksisomale defekte en omrede die toets nie deel vorm van roetine-analises nie, word baie pasiënte nie gediagnoseer nie (Korman *et al*, 2000).

Potensiële metaboliete wat aangewend kan word as siftingsmetaboliete, gaan ondersoek word. Twee benaderingswyses gaan gevolg word. Pasiënte wat reeds met peroksisoomdefekte gediagnoseer is, se organiese suur profiele gaan ondersoek word vir moontlike merkers. Verder gaan pasiënte, waarop daar reeds organiese suur analyses uitgevoer is, weer nagegaan word. Die pasiënte met verhoogde serummetaboliete, wat vanaf peroksisomale oorsprong kan wees, sal opgevolg word met die nodige diagnostiese analyses.

HOOFSTUK 3

STABIELE ISOTOOPVERDUNNINGSMETODE VIR DIE BEPALING VAN BAIE- LANGKETTINGVETSURE , FITAANSUUR EN PRISTAANSUUR

3.1 Inleiding

Daar is reeds 'n aantal metodes gepubliseer om baie-langkettingvetsure (BLKVS/LCFA) of pristaansuur en fitaansuur te bepaal. Slegs 'n paar metodes maak dit egter moontlik om gelyktydig hierdie verbindings te bepaal. Die voordeel van so 'n analise is voor-die-hand-liggend: dit laat toe dat defekte in peroksisoombiogenese of β -oksidase opgespoor kan word en dat dieselfde bepaling gebruik kan word vir die diagnose van volwasse Refsum se siekte en Rhizomeliese chondrodisplasie punktata (Vreken *et al*, 1998).

In hierdie studie is 'n vinnige, sensitiewe metode gebruik om gelyktydig BLKVS/LCFA, pristaansuur en fitaansuur te meet met gaschromatografie-elektronimpakmassaspektrometrie (Vreken *et al*, 1998). Stabiele isotope vir elk van die vetsure is gebruik as interne standaarde en dit het 'n groot voordeel bo die gebruik van konvensionele interne standaarde omdat dit inherent dieselfde molekule is as dié wat geanaliseer word en dus dieselfde fisiese en chemiese eienskappe het, terwyl dit steeds selektief opspoorbaar is deur massaspektrometrie (Chalmers & Lawson, 1982).

Omdat 'n verbinding geïdentifiseer kan word deur slegs 'n paar ione op die massaspektrum, kan enkele ioonmonitering aangewend word om 'n baie meer sensitiewe analise van verbindings te kry. Die hoofdoelwitte van enkele ioonmonitering, is die deteksie van geselekteerde verbindings met 'n baie hoë sensitiwiteit en die akkurate kwantifisering van verbindings (Chalmers & Lawson, 1982).

3.2 Reagense en chemikalieë

Fitaansuur (P4060) 96% suiwer, pristaansuur (P6617) 98% suiwer, dokosanoësuur (C22:0) (B7644) 99% suiwer, tetrakosanoësuur (C24:0) (L6641) 99% suiwer, heksakosanoësuur (C26:0) (H0388) 99% suiwer en N-metiel-N-(tert-butioldimetieelsiliet)trifluoroasetamied (MTBSTFA) (394882) is aangekoop vanaf Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA).

$3,3,5,5\text{-}^2\text{H}_4\text{-C22:0}$ (isotopiese suiwerheid > 98%), $3,3,5,5\text{-}^2\text{H}_4\text{-C24:0}$ (isotopiese suiwerheid > 98%), $3,3,5,5\text{-}^2\text{H}_4\text{-C26:0}$ (isotopiese suiwerheid > 98%), $^2\text{H}_3$ -fitaansuur en $^2\text{H}_3$ -pristaansuur is verkry vanaf Dr. H.J. ten Brink, Free University Hospital (Amsterdam, Nederland).

Alle organiese oplosmiddels en ander chemikalieë wat in hierdie metode gebruik is, was van analitiese graad.

3.3 Voorbereiding van standaardoplossings

3.3.1 Interne standaardoplossing

Van elk van die deuteriumgemerkte interne standaarde, is daar eers voorraadoplossings gemaak met die volgende konsentrasies: 0.25 mmol/L pristaansuur-d3, 0.25 mmol/L fitaansuur-d3, 1 mmol/L C22:0-d4, 1 mmol/L C24:0-d4 en 0.5 mmol/L C26:0-d4, in tolueen. Verskillende volumes van hierdie voorraadoplossings is dan bymekaar gevoeg om 'n werksoplossing voor te berei. Die finale konsentrasie van die deuteriumgemerkte interne standaarde was 5 $\mu\text{mol/L}$ pristaansuur-d3, 8 $\mu\text{mol/L}$ fitaansuur-d3, 50 $\mu\text{mol/L}$ C22:0-d4, 50 $\mu\text{mol/L}$ C24:0-d4 en 5 $\mu\text{mol/L}$ C26:0-d4.

3.3.2 Suurhidrolise-oplossing

Die suurhidrolisereagens bestaan uit 'n mengsel van 37 % HCl en asetonitriël, wat in 'n 1:23 verhouding gemeng is.

3.3.3 Alkaliesehidrolise-oplossing

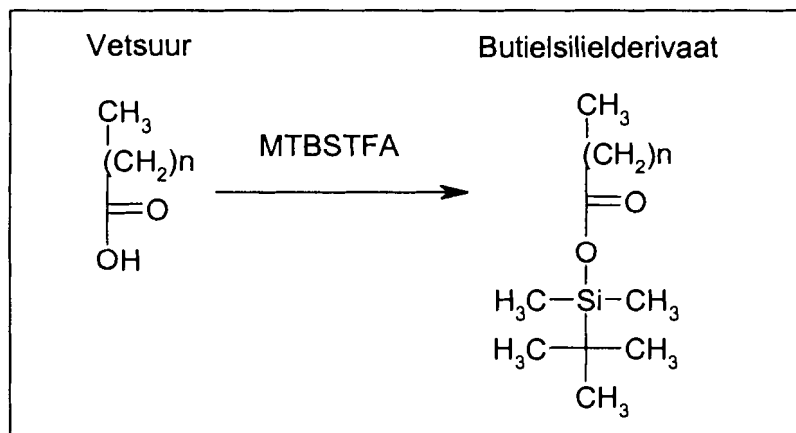
Die alkaliesehidrolisereagens is 'n 1-M-NaOH-oplossing in metanol.

3.4 Monsterversameling

Ten minste 1 ml serum word benodig vir hierdie analise. Die bloedmonster word gesentrifugeer teen $3\,000 \times g$ vir 5 min by kamertemperatuur en die serum word oorgegoot in 'n ander buis. Die monster word dan gevries by $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ totdat die analise uitgevoer word.

3.5 Monstervoorbereiding

Vir die suksesvolle uitvoering van hierdie analise is 0.1 ml serum gebruik. Dit is met 0.1 ml van die interne standaard en 2 ml van die suurhidrolisereagens in 'n glasbuis vir 45 ± 5 min gehidroliseer by $110 \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ná hidrolise is die monster afgekoel tot kamertemperatuur. Die monster is dan met 2 ml van die alkaliesehidrolise-oplossing gehidroliseer vir 45 ± 5 min by $110 \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ná afkoeling tot by kamertemperatuur is die pH van die mengsel verlaag deur 0.4 ml 37 % HCl by te voeg. Die vetsure is geëkstraheer in 4 ml hekasaan. Om die meeste van die sterole te verwyder, is die organiese laag gewas met 3.5 ml 1 M KOH. Die pH van die waterige fase is weer verlaag deur 0.5 ml 37% HCl by te voeg. Die vetsure word dan weer geëkstraheer in 4 ml hekasaan en die organiese laag gedroog onder stikstof. Die monster word dan gederivatiseer met MTBSTFA en piridien ($50\text{ }\mu\text{l}$ van elk) by $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vir 30 minute (sien figuur 8), waarna dit weer eens onder stikstof gedroog is. Net voordat die GC-MS analise gedoen is, is die monster opgelos in 0.2 ml hekasaan (Vreken *et al*, 1998).



Figuur 8: Reaksievergelyking van die derivatiseringstap van die vetsure (Vreken *et al*, 1998).

3.6 Die GC-MS analise

Die vetsure is geanaliseer op 'n Hewlett-Packard model 6890/5973 GC-MS sisteem met 'n 122-0132 DB-1ms kapillêre kolom (30m x 0.25mm x 0.25 μ m) (Agilent Technologies, Chemetrix, Midrand, Suid-Afrika). Vir die skeiding van vetsure, het die temperatuurprogram begin by 60 °C vir 1 minuut waarna dit styg teen 30 °C/min tot by 240 °C, 10 °C/min tot by 270 °C en dan teen 4 °C/min tot by 300 °C. Hierdie temperatuur word behou vir 3 minute. Die monster is op die splitlose metode ingespuut by 'n temperatuur van 300 °C. Die inspuutvolume is 1 μ l en helium (14.99 psi) is as draergas gebruik. Elektronimpakionisasie is toegepas teen 70 eV. Die massaspektrometer is op die SIM (enkele-ioonmonitor) metode gestel en monitor die kenmerkende $[M - 57]^+$ ione in verskillende tydsintervalle (Tabel 1).

Tabel 1: Enkele ioon monitering

Verbinding	[M – 57] ⁺
Pristaansuur	355.3
[² H ₃]-Pristaansuur	358.3
Fitaansuur	369.3
[² H ₃]-Fitaansuur	372.3
C22:0	397.4
[² H ₄]-C22:0	401.4
C24:0	425.4
[² H ₄]-C24:0	429.4
C26:0	453.4
[² H ₄]-C26:0	457.4

3.7 Verwerking van resultate

Die GC-MS data is kwantitatief geanaliseer met die HP-Chemstation sagteware, wat dit moontlik maak om die massaspektra volledig te analiseer. Die vetsure is gekwantifiseer deur gebruik te maak van kalibrasiekrommes wat verkry is vir elke individuele vetsuur. Die konsentrasies is bereken deur middel van liniêre regressie.

HOOFSTUK 4

METODE VIR DIE ANALISERING VAN ORGANIESE SURE IN URIENE

4.1 Inleiding

Die analise van organiese sure deur GC-MS tegnieke is goed gevestig en is 'n belangrike prosedure om aangebore metabolisme defekte te diagnoseer. Die belangrike stappe in hierdie prosedure is isolasie van die organiese sure uit fisiologiese vloeistowwe, die vorming van vlugtige derivate en die GC-MS analise (Chalmers & Lawson, 1982).

4.2 Reagense en chemikalieë

HCl, Na₂SO₄, etielasetaat, and dietieleter is aangekoop vanaf Merck Chemical Co. (Darmstadt, Duitsland). Trimetielchlorosilaan (TMCS) (C7,285-4), Bis(trimetiellsiliel)trifluoroasetamied (BSTFA) (T1506), and 3-fenielbottersuur (78243) is aangekoop vanaf Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA).

4.3 Monsterversameling

Vir die organiese suur analise word ten minste 5 ml uriene benodig, afhangende van die kreatinienwaarde. Vir die beste resultate moet die monster versamel word sonder 'n preserveermiddel en dit moet dadelik gevries word en kan so gestoor word totdat die analise uitgevoer word.

4.4 Monstervoorbereiding

4.4.1 Die kreatinienwaardes

Vir kwantitatiewe doeleindes is dit noodsaaklik om die organiese sure se konsentrasies uit te druk ten opsigte van 'n verwysingsmetaboliet. Kreatinien (2-imino-1-metiel-4-imidazolidinoon) word algemeen vir hierdie doel gebruik. 'n Verwysingsmetaboliet is essensieel omdat uriene teen verskillende vloeitempo's uitgeskei word. Die totale volume uriene as verwysing is dus onprakties. Die akkurate bepaling van die kreatinienkonsentrasie in uriene voor die organiese suur analise is dus noodsaaklik (Chalmers & Lawson, 1982). Die kreatinienwaardes in hierdie studie is deur die Ampath-patologiegroep (Potchefstroom) bepaal. Die kreatinienwaarde word uitgedruk as mmol/L en moet omgeskakel word na 'n mg% waarde. Die volgende vergelyking word hiervoor gebruik:

$$\text{mmol/L kreatinien} \times 11.312 = \text{mg \% kreatinien}$$

Die mg % kreatinienwaarde gee dan 'n aanduiding van die hoeveelheid uriene wat gebruik moet word vir die analise. Indien die mg % kreatinienwaarde $> 5\% = 2 \text{ ml}$, $> 2\% = 3 \text{ ml}$ $> 100\% = 0.5 \text{ ml}$ en andersins word 1 ml uriene gebruik. Die mg % kreatinienwaarde word ook gebruik om te bepaal hoeveel interne standaard om by te voeg:

$$\text{mg \% kreatinien} \times 5 = \text{volume interne standaard (ml)}$$

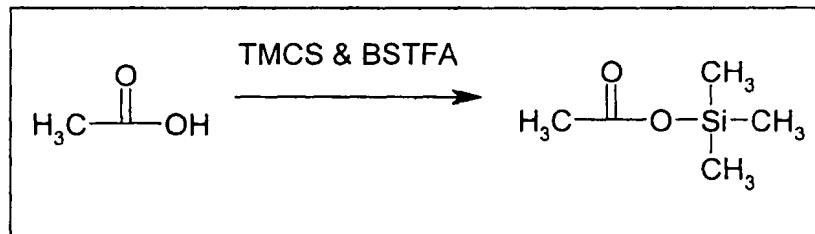
Om te bepaal hoeveel derivatiseringsreagense gebruik moet word, word die volgende formules gebruik:

$$\begin{aligned} \text{mg \% kreatinien} \times 0.6 &= \text{volume TMCS (ml)} \\ \text{mg \% kreatinien} \times 3 &= \text{volume BSTFA (ml)} \end{aligned}$$

4.4.2 Ekstraksie van organiese sure

Vir die ekstraksies van die organiese sure word 'n volume uriene by 'n volume 3-fenielbottersuur (interne standaard, 3.197 mmol/L) gevoeg soos bereken vanaf die kreatinienwaarde. Die pH word verlaag tot ongeveer 1 deur 'n paar druppels 5M HCl by te voeg, gevolg deur die ekstraksie van die organiese sure deur 6 ml etielasetaat

by te voeg. Die oplossing word gemeng vir 30 minute en dan gesentrifugeer vir 3 minute by 2 000 x g. Die organiese fase word oorgedra na 'n ander buis en 3 ml diëtleter word by die waterige fase gevoeg. Hierdie mengsel word gemeng vir 10 minute, waarna dit vir 3 minute gesentrifugeer word by 2 000 x g. Die organiese fase word gemeng met die etielasetaatfase. Nadat Na₂SO₄ (≈100mg) bygevoeg is, word die mengsel gevorteks en die organiese laag weer oorgedra na 'n ander buis. Die organiese fase word dan gedroog onder stikstof, waarna dit gederiviseer word met BSTFA en TMCS vir 45 minute by 70°C (Erasmus *et al*, 1985; Wurth *et al*, 1989; Mardens *et al*, 1992; Suh *et al*, 1997).



Figuur 9: Reaksievergelyking van die derivatiseringstap van organiese sure.

4.5 Die GC-MS analise

Die organiese sure word geanaliseer op 'n Hewlett Packard model 6890/5973 GC-MS sisteem met 'n 122-0132 DB-1ms kapillêre kolom (30m x 0.25mm x 0.25 μ m) (Agilent Technologies, Chemetrix, Midrand, Suid-Afrika). Die temperatuurprogram begin by 60 °C vir 2 minute, waarna dit styg teen 4 °C/min tot 120 °C en dan teen 6 °C/min tot 285 °C. Hierdie temperatuur word behou vir 2 minute. Die monster word splitloos ingespuut met 'n aanvanklike temperatuur van 280 °C. Die inspuutvolume is 1 μ l. Helium word gebruik as die draergas teen 'n druk van 17.73 psi. Elektronimpakionisasie word toegepas teen 70 eV en die massaspektrum word op die skanderingmetode gestel.

4.6 Verwerking van resultate

Die identifisering van organiese sure op die chromatogram is gedoen met 'n *automated mass spectral deconvolution and identification system* (AMDIS sagteware) en 'n biblioteek met ongeveer 1 100 algemene organiese sure wat saamgestel is by die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte, Vakgroep

Biochemie, Skool vir Biochemie aan die Noord-Wes Universiteit (Potchefstroomkampus). Die geïdentifiseerde organiese sure word gekwantifiseer deur gebruik te maak van die volgende vergelyking:

$$\text{Organiese suur (mg/g kreatinien)} = \text{Area}_{(\text{organiese suur})} / \text{Area}_{(\text{IS})} \times 262.5$$

Om die konsentrasies van die organiese sure uit te druk as mmol/mol kreatinien, word die volgende vergelyking gebruik:

$$\text{Organiese suur (mmol/mol kreatinien)} = \frac{\text{Organiese sure (mg/g kreatinien)}}{\text{Mr (spesifieke organiese suur)} \times \text{Mr (kreatinien)}}$$

HOOFSTUK 5

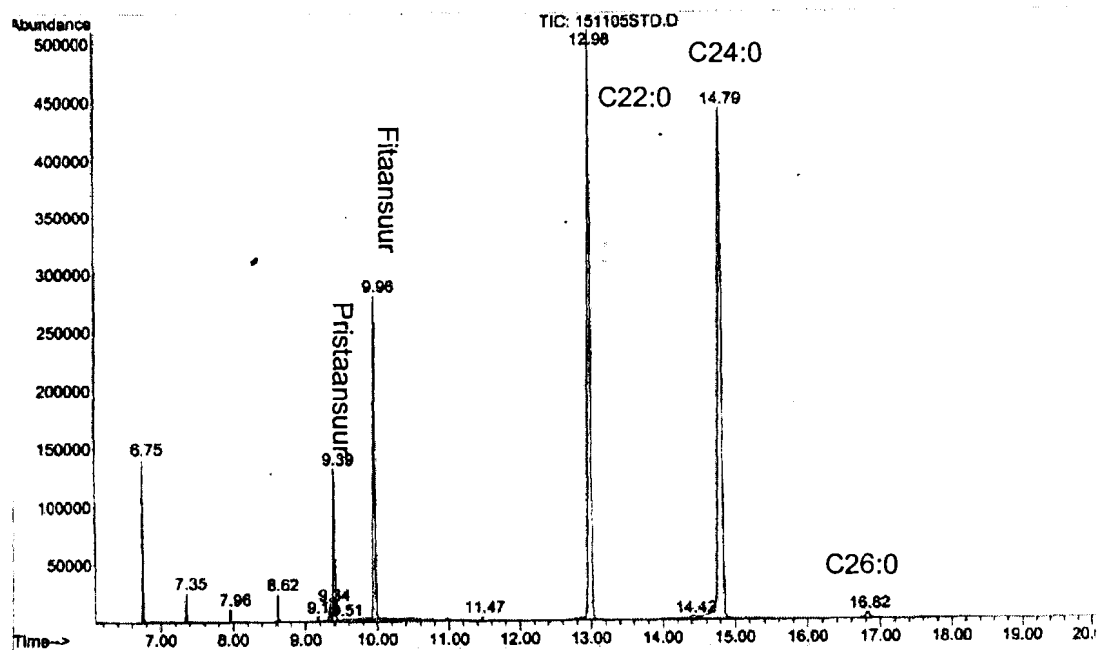
STABIELE ISOTOOPVERDUNNINGSMETODE VIR DIE BEPALING VAN BAIE- LANGKETTINGVETSURE, FITAANSUUR EN PRISTAANSUUR

5.1 Inleiding

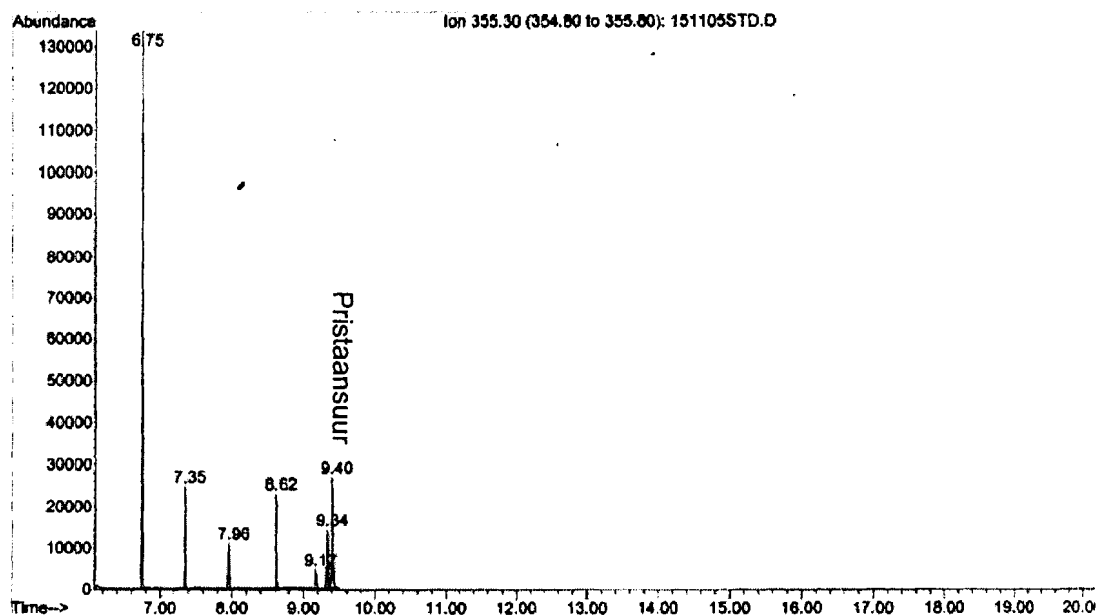
Die validasie en standaardisering van 'n metode behels die volgende: (1) Selektiwiteit – Dit is die vermoë van 'n metode om 'n verbinding akkuraat te meet in die teenwoordigheid van ander verbindings wat in die monstermatriks teenwoordig is. Dit word bereik deur die regte kolom, temperatuurprogram en interne standaarde vir die verbindings, wat ondersoek word, te gebruik; (2) Presisie – Dit is die mate waartoe resultate van verskeie analyses van 'n reeks standaarde ooreenstem met mekaar. Aanvaarbare presisie vir biologiese monsters is 15% by die konsentrasielimiete en 10% by ander konsentrasievlakke. Goeie herhaalbaarheid is 'n vereiste vir goeie presisie; (3) Akkuraatheid en herwinning – Die akkuraatheid van 'n metode is die mate waartoe die resultate wat gegenereer word, ooreenstem met die waarde wat dit werklik is. Dit word bepaal deur 'n monster met bekende konsentrasies te analiseer; (4) Liniariteit en kalibrasiekurwes – Die liniariteit van 'n metode is die vermoë van die metode om resultate te lewer wat direk eweredig is aan die konsentrasies van die verbindings wat geanaliseer word binne spesifieke grense; (5) Deteksielimiete en kwantifiseringslimiete – Die deteksielimiet van die metode is die laagste konsentrasie wat deur die metode “raakgesien” kan word, maar nie noodwendig gemeet kan word nie. Die kwantifiseringslimiet is die laagste konsentrasie van die verbinding wat akkuraat gekwantifiseer kan word. Daar is geen basiese riglyne oor die volgorde waarin die standaardisering en validasie-eksperimente uitgevoer moet word nie en is afhanklik van die metode self (Hurber, 2001).

5.1.1 Nonadekanoësuur (C19:0) en Pentakosanoësuur (C25:0) as interne standaarde

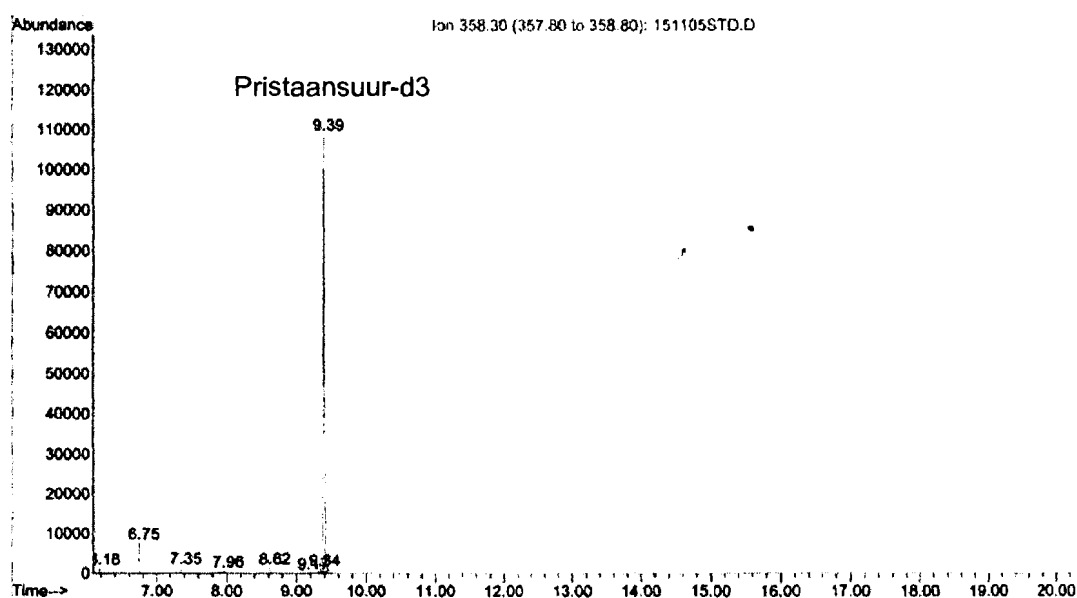
Daar is aanvanklik gepoog om nonadekanoësuur en pentadekanoësuur te gebruik as interne standaarde vir 'n aanvanklike siftingsmetode. Indien daar verhoogde C24:C22 en C26:C22 verhoudings in pasiëntmonsters gevind word, sou die bepaling herhaal word met die stabiele isotope as interne standaarde. Hierdie benadering was egter nie suksesvol nie, aangesien: (1) die kommersieel beskikbare nonadekanoësuur en pentadekanoësuur gekontamineer was met ander vetsure en dus nie akkuraat was om die vetsure mee te kwantifiseer nie; (2) die sensitiviteit van die metode met nonadekanoësuur en pentadekanoësuur as interne standaarde, was te laag. Deur eerder stabiele isotope as interne standaarde te gebruik, word die selektiwiteit van die metode dus verbeter. In figuur 10 word 'n voorbeeld van 'n chromatogram van die vetsuurstandaarde gee en die opeenvolgende figure (Figuur 11 – Figuur 20) word chromatogramme van die individuele vetsure sowel as die deuteriumgemerkte vetsure gegee.



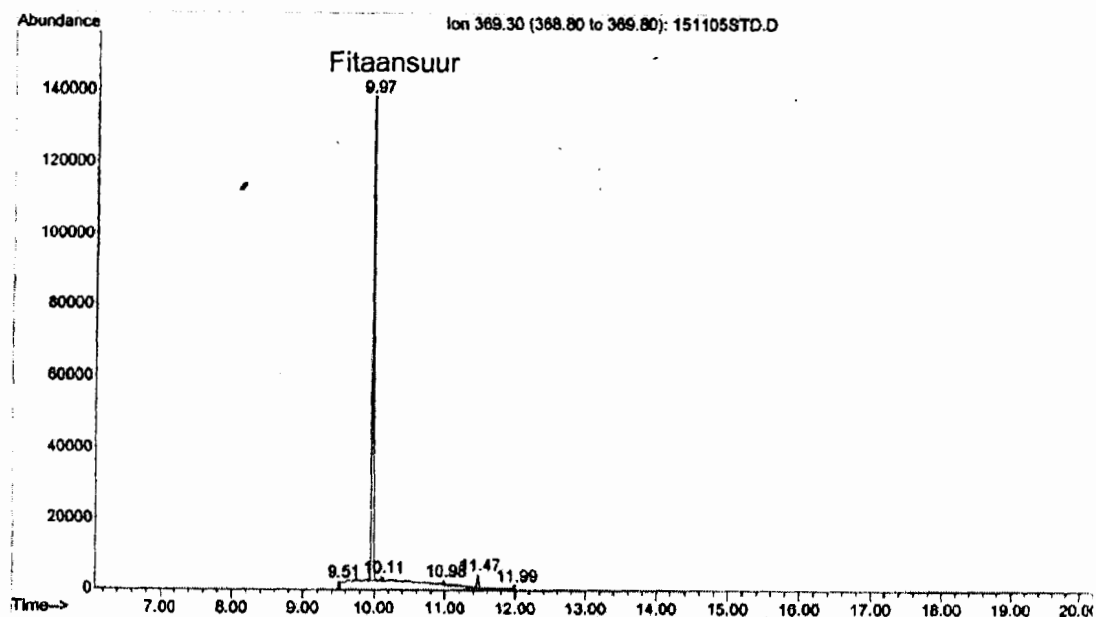
Figuur 10: Chromatogram van die vetsuurstandaarde



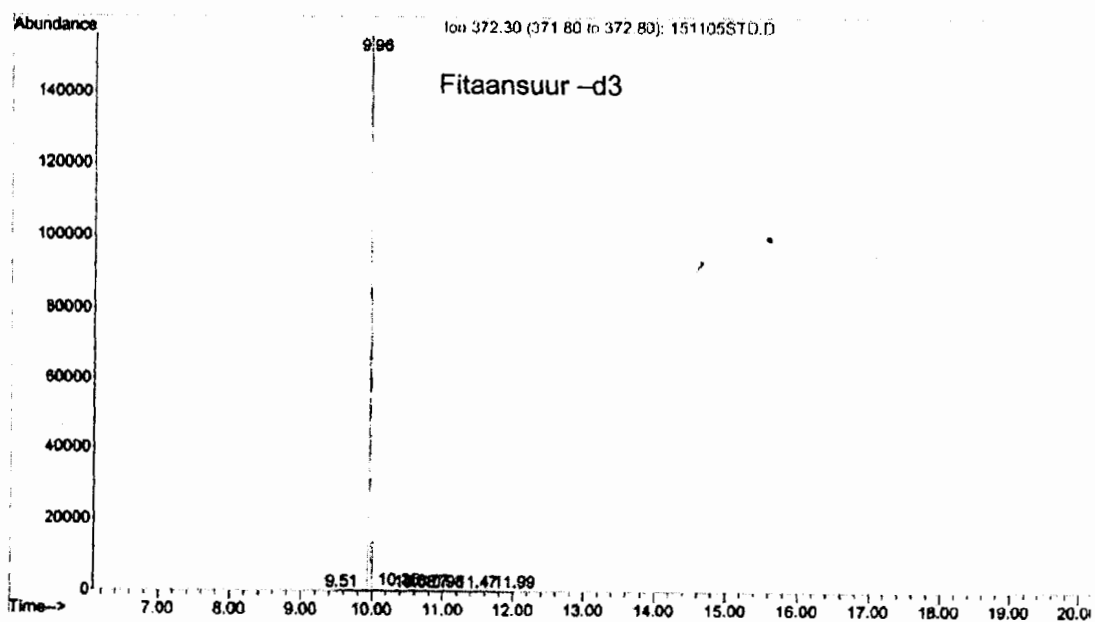
Figuur 11: Chromatogram van pristaansuur



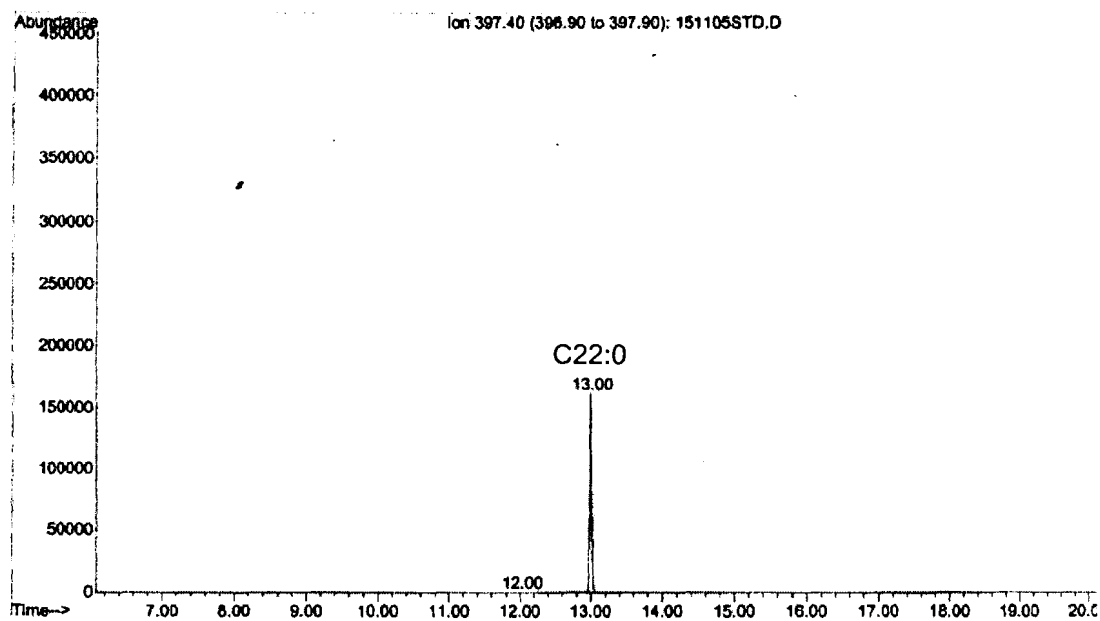
Figuur 12: Chromatogram van pristaansuur-d3



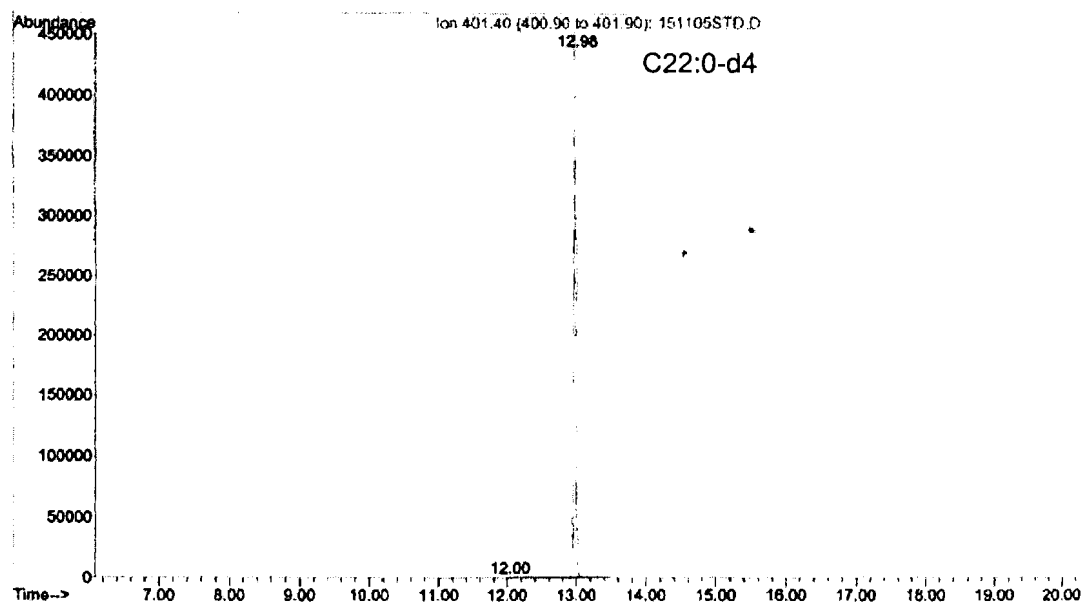
Figuur 13: Chromatogram van fitaansuur



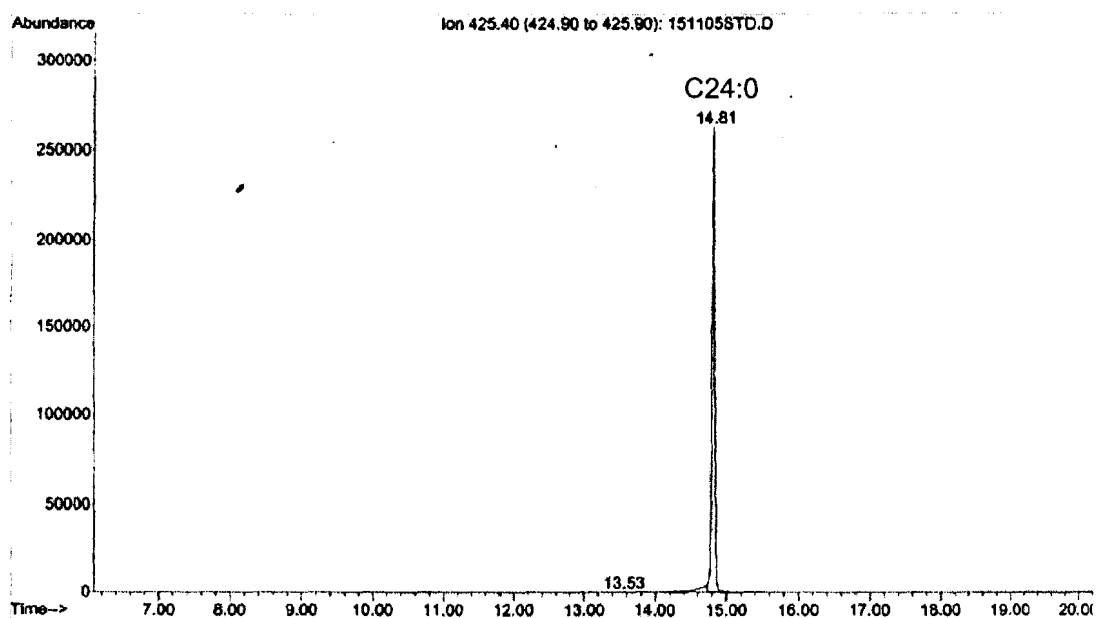
Figuur 14: Chromatogram van fitaansuur-d3



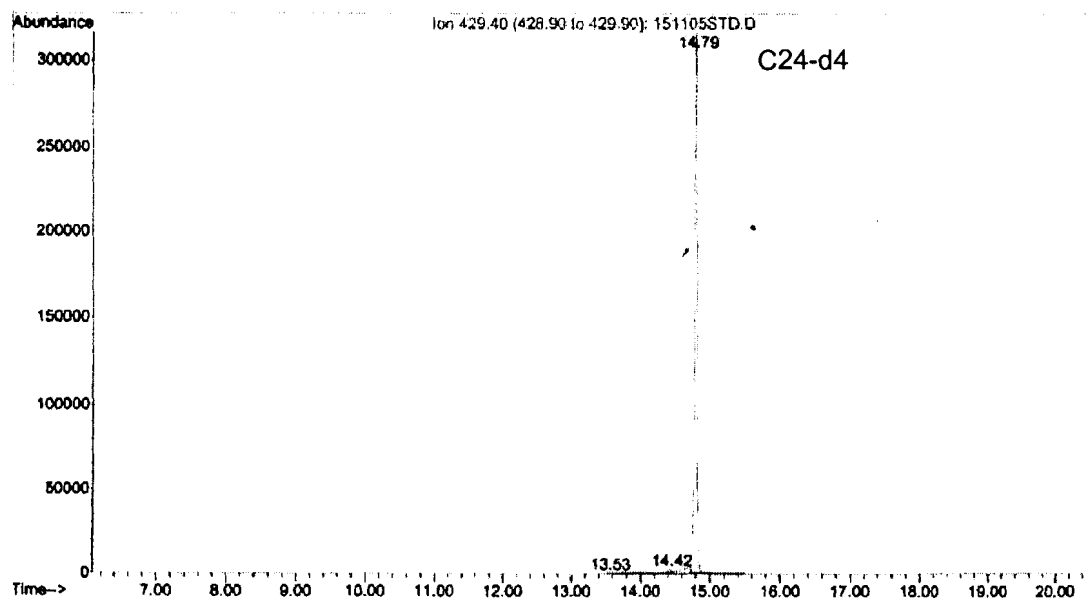
Figuur 15: Chromatogram van C22:0



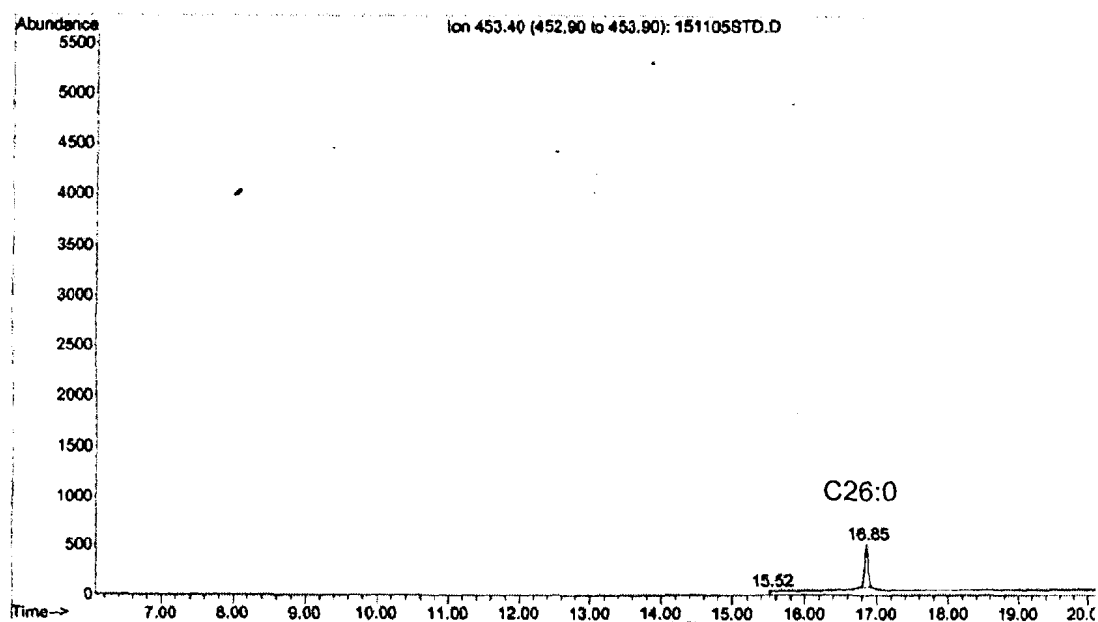
Figuur 16: Chromatogram van C22-d4



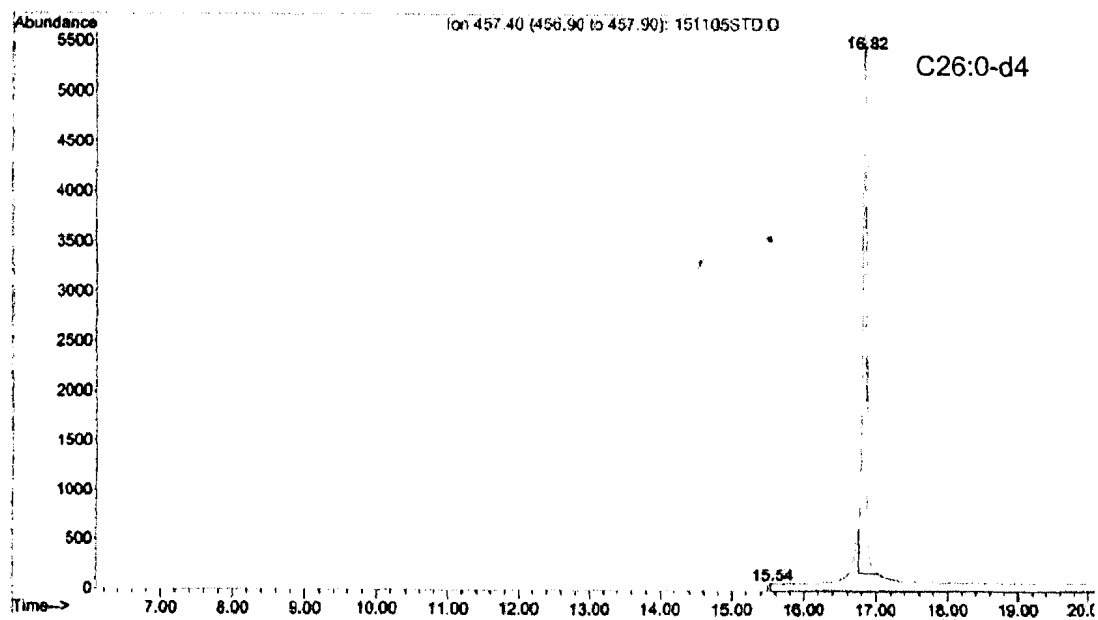
Figuur 17: Chromatogram van C24:0



Figuur 18: Chromatogram van C24-d4



Figuur 19: Chromatogram van C26:0



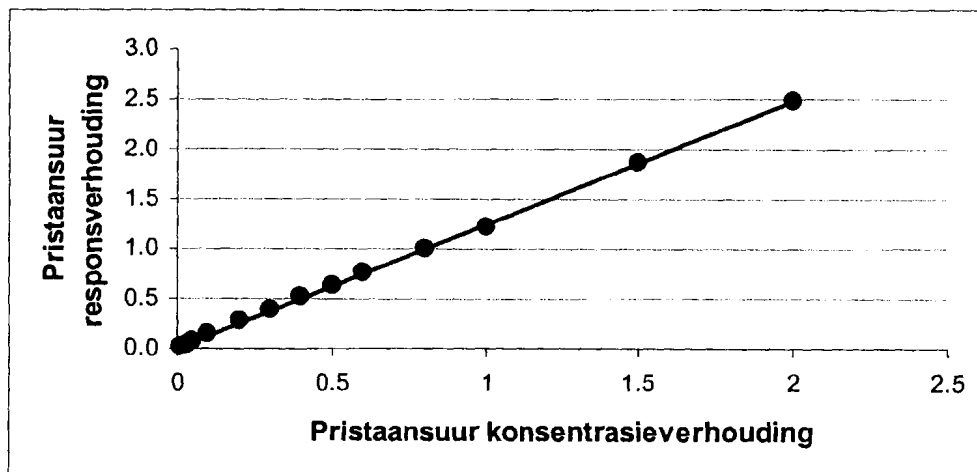
Figuur 20: Chromatogram van C26-d4

5.1.2 Die liniêre gebied, kalibrasiekrommes en kwantifiseringslimiete

Vir die bepaling van die liniêre gebied van die verskillende vetsure, is daar 'n konsentrasiereeks van elk van die vetsure voorberei. Die konsentrasiereeks is so gekies om te verseker dat waardes laer as die normaal en hoër as die verhoogde waardes, ingesluit is. Hierdie kalibrasiekrommes is verder gebruik vir die kwantifisering van vetsure deur gebruik te maak van liniêre regressie. Op die Y-as word die reponsverhouding aangetoon; dit is die oppervlakte onder die piek van die vetsuur gedeel deur die oppervlakte onder die piek van die deuteriumgemerkte vetsuur. Die x-as verteenwoordig die konsentrasieverhouding wat op dieselfde manier as die reponsverhouding bereken is.

5.1.2.1 Pistaansuur

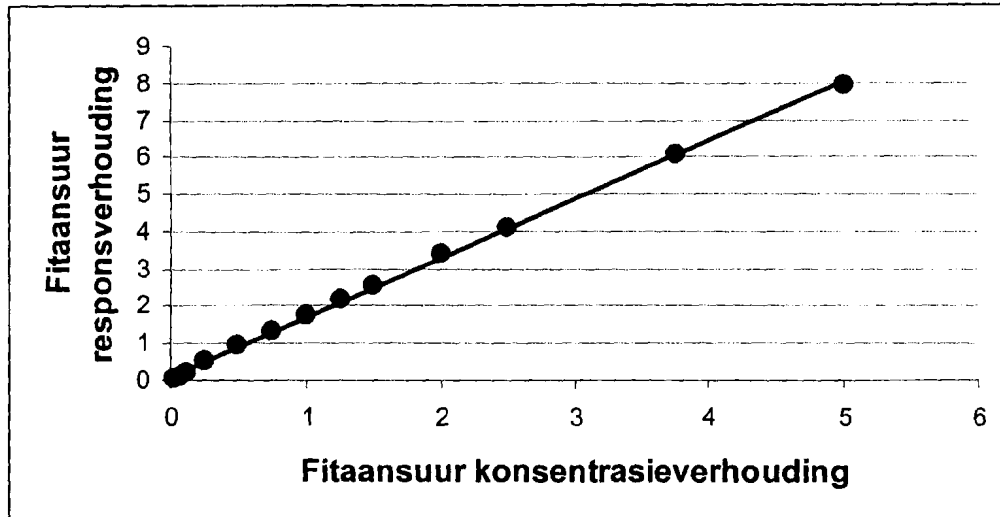
Vir pistaansuur is 'n konsentrasiereeks saamgestel, wat strek vanaf $0.015 \mu\text{mol/L}$ tot $125 \mu\text{mol/L}$. Die liniêre gebied strek egter net vanaf $0.0375 \mu\text{mol/L}$ tot $7.5 \mu\text{mol/L}$. Die kwantifiseringslimiete vir pistaansuur is dus $> 0.0375 \mu\text{mol/L}$ en $< 7.5 \mu\text{mol/L}$.



Figuur 21: Die kalibrasiekromme vir pistaansuur. Die oplossing van die vergelyking is $y = 1.23x + 0.0143$ ($R^2 = 0.99$).

5.1.2.2 Fitaansuur

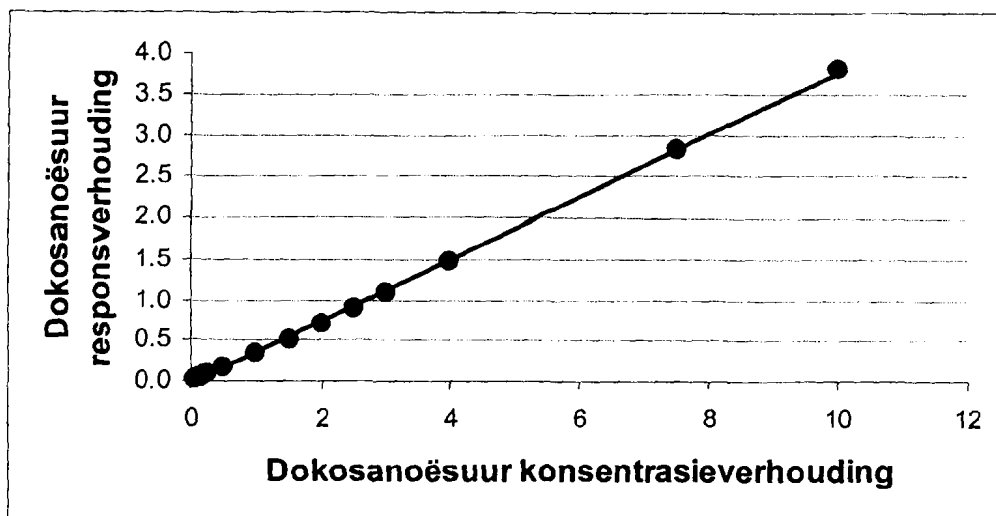
Die fitaansuurkonsentrasiereeks wat saamgestel is, strek vanaf $0.015 \mu\text{mol/L}$ tot $125 \mu\text{mol/L}$. Die liniêre gebied strek egter slegs vanaf $0.375 \mu\text{mol/L}$ tot $15 \mu\text{mol/L}$. Die kwantifiseringslimiete vir fitaansuur is dus $> 0.375 \mu\text{mol/L}$ en $< 15 \mu\text{mol/L}$.



Figuur 22: Die kalibrasiekromme vir fitaansuur. Die oplossing van die vergelyking is $y = 1.59x + 0.11$ ($R^2 = 0.99$).

5.1.2.3 Dokosanoësuur (C22:0)

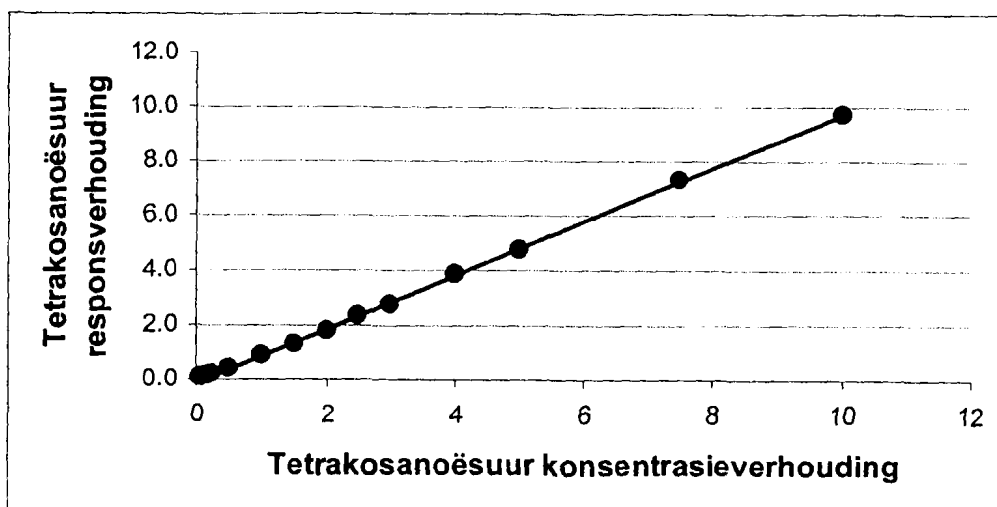
Vir dokosanoësuur (C22:0) is 'n konsentrasiereeks saamgestel, wat strek vanaf $0.15 \mu\text{mol/L}$ tot $500 \mu\text{mol/L}$. Die liniêre gebied strek egter slegs vanaf $7.5 \mu\text{mol/L}$ tot $500 \mu\text{mol/L}$. Die kwantifiseringslimiete vir dokosanoësuur is dus $> 7.5 \mu\text{mol/L}$. Die boonste kwantifiseringslimiet is hoër as die voorraadoplossingskonsentrasie en is daarom nie hier aangetoon nie. Dit is ook baie onwaarskynlik dat waardes hoër as $500 \mu\text{mol/L}$ in pasiëntserum aangetref sal word.



Figuur 23: Die kalibrasiekromme vir dokosanoësuur. Die oplossing van die vergelyking is $y = 0.379x - 0.03$ ($R^2 = 0.99$).

5.1.2.4 Tetrakosanoësuur (C24:0)

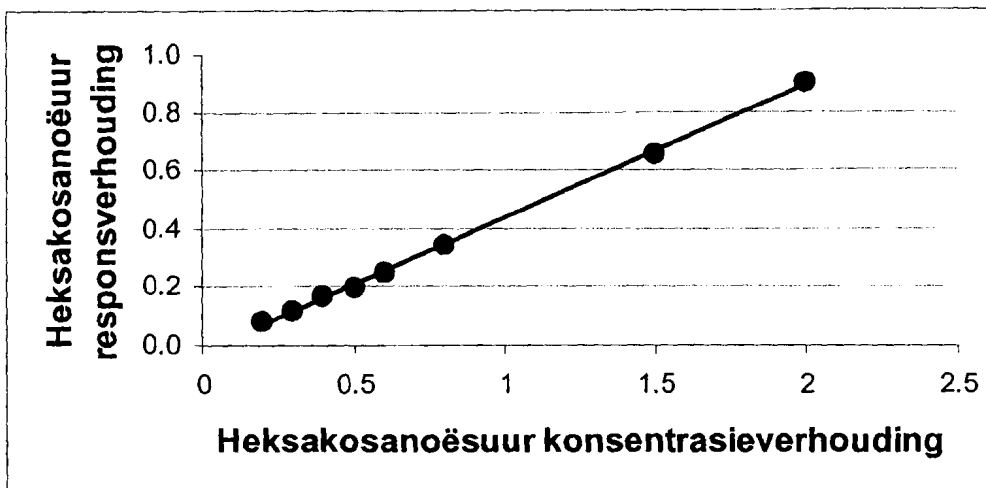
Vir tetrakosanoësuur (C24:0) is 'n konsentrasiereeks saamgestel, wat strek vanaf $0.15 \mu\text{mol/L}$ tot $500 \mu\text{mol/L}$. Die liniêre gebied strek egter slegs vanaf $1.5 \mu\text{mol/L}$ tot $250 \mu\text{mol/L}$. Die bepalingsgrense vir tetrakosanoësuur is dus $> 1.5 \mu\text{mol/L}$ en $< 250 \mu\text{mol/L}$.



Figuur 24: Die kalibrasiekromme vir tetrakosanoësuur. Die oplossing van die vergelyking was $y = 0.98x - 0.09$ ($R^2 = 0.99$).

5.1.2.5 Heksakosanoësuur (C26:0)

Vir heksakosanoësuur (C26:0) is 'n konsentrasiereeks saamgestel, wat strek vanaf $0.075 \mu\text{mol/L}$ tot $250 \mu\text{mol/L}$. Die liniêre gebied strek egter net vanaf $0.15 \mu\text{mol/L}$ tot $30 \mu\text{mol/L}$. Die kwantifiseringslimiete vir C26:0 is dus $> 0.15 \mu\text{mol/L}$ en $< 30 \mu\text{mol/L}$.



Figuur 25: Die kalibrasiekromme van heksakosanoësuur. Die oplossing van die vergelyking is $y = 0.46x - 0.02$ ($R^2 = 0.99$).

5.1.2.6 Bespreking

Dit is duidelik dat daar 'n baie goeie liniêre verwantskap is tussen die konsentrasieverhouding en die responsverhouding vir al die vetsure (Figure 21 tot 25). Die kwantifiseringslimiete van die metode vir elke vetsuur is laer as die normaalwaardes en hoër as die verhoogde waardes. Dit laat akkurate bepaling en kwantifisering van die vetsure toe, wat noodsaaklik is vir diagnostiese doeleindes. Die deteksielimiete vir elk van die vetsure is laer as die laagste konsentrasie wat in elke reeks gebruik is, omdat die vetsure nog gesien word maar nie meer akkuraat gekwantifiseer word nie.

5.1.3 Herwinning van vetsure ná die ekstraksieproses

Om die herwinning van die vetsure ná die ekstraksieproses te bepaal, is twee benaderingswyses gevolg. (1) 'n Aantal standarde binne die meetbare grense van die metode is geneem en die ekstraksieproses is in triplikaat daarop uitgevoer. (2) 'n

Serummonster is geëkstraheer en die konsentrasies van die vetsure bepaal. Dieselfde serummonster is dan met verskillende konsentrasies vetsuurstandaarde verryk en weer geëkstraheer om die herwinning vanuit 'n fisiologiese monster te bepaal. Die volgende formule is gebruik om die herwinning ná die ekstraksieproses te bereken:

$$\text{Herwinning (\%)} = \text{Praktiese konsentrasie} / \text{Teoretiese konsentrasie} \times 100$$

Tabel 2: Die herwinning van elk van die vetsure wat op die standaardte uitgevoer is

Vetsuur	Teoretiese Konsentrasie (μmol/L)	Praktiese Konsentrasie (μmol/L)*	Herwinning (%)	Teoretiese Konsentrasie (μmol/L)	Praktiese Konsentrasie (μmol/L)*	Herwinning (%)	Teoretiese Konsentrasie (μmol/L)	Praktiese Konsentrasie (μmol/L)*	Herwinning (%)	Gemiddelde herwinning (%)
Pristaansuur	0.50	0.47	94	1.00	0.99	99	5.00	4.93	99	97
Fitaansuur	2.00	1.94	97	4.00	4.04	101	20.00	19.85	99	99
C22:0	25.0	26.10	104	50.00	49.47	99	250.00	253.36	101	102
C24:0	25.0	26.02	104	50.00	48.94	98	250.00	248.37	99	100
C26:0	0.50	0.70	140	1.00	1.10	110	5.00	4.71	94	115

* Gemiddelde konsentrasie verkry nadat ekstraksieproses in triplikaat uitgevoer is

Tabel 3: Die herwinning van elk van die vetsure wat op die verrykte serummonster uitgevoer is

Vetsuur	Gemiddelde Konsentrasie in serummonster ($\mu\text{mol/L}$)	Teoretiese Konsentrasie na verryking ($\mu\text{mol/L}$)	Praktiese Konsentrasie ($\mu\text{mol/L}$)*	Herwinning (%)	Teoretiese Konsentrasie na verryking ($\mu\text{mol/L}$)	Praktiese Konsentrasie ($\mu\text{mol/L}$)*	Herwinning (%)	Gemiddelde herwinning (%)
Pristaansuur	0.13	1.13	1.04	92	5.13	4.78	93	92
Fitaansuur	0.58	4.58	3.78	83	20.58	19.25	94	88
C22:0	143.19	193.19	153.01	79	393.19	284.88	73	76
C24:0	40.27	90.27	80.39	89	290.27	250.83	86	88
C26:0	1.17	2.17	2.62	121	6.17	4.58	74	98

* Gemiddelde konsentrasie verkry nadat ekstraksieproses in triplikaat uitgevoer is

Tabel 4: 'n Vergelyking tussen die herwinningsresultate van verrykte serummonsters wat in hierdie studie verkry is en die resultate wat in die literatuur gegee word (Vreken *et al.* 1998)

Vetsuur	Herwinning (%) (Vreken <i>et al.</i> 1998)	Herwinning (%)
Pristaansuur	96	92
Fitaansuur	85	88
C22:0	94	76
C24:0	93	88
C26:0	86	98

5.1.3.1 Bespreking

In die eerste benaderingswyse, waar standaard gebruik is om die herwinning van die vetsure te bepaal, is baie goeie herwinning gekry (Tabel 2). Vir C26:0 is daar by 'n konsentrasie van 0.5 $\mu\text{mol/l}$ egter 'n herwinning van 140 % gekry, wat uitermatig hoog is. Die onderste kwantifiseringslimiet van C26:0 is 0.15 $\mu\text{mol/L}$ en daarom is dit nie 'n geval van foutiewe kwantifisering nie. Die onderste normaalgrens van C26:0 is in die omgewing van 0.5 $\mu\text{mol/l}$ (Tabel 6) en daarom sal dit nie 'n diagnose beïnvloed nie en word dit so aanvaar.

In die tweede benaderingswyse wat gevolg is, is die konsentrasies van die vetsure in 'n serummonster bepaal, waarna die serummonsters met vetzuurstandaarde verryk is. Hier is die herwinning vanuit die fisiologiese medium bepaal omdat dit die medium is waarin die vetsure bepaal word. Die herwinning van die vetsure ná die ekstraksieproses vanuit 'n fisiologiese medium, was relatief goed (Tabel 3) en vergelyk ook goed met die waardes wat in die literatuur gegee word (Tabel 4).

5.1.4 Herhaalbaarheid van die metode

5.1.4.1 Intra-analise herhaalbaarheid (herhaalbaarheid van die ekstraksieproses)

Om die intra-analise herhaalbaarheid (herhaalbaarheid van die ekstraksieproses) te bepaal, is daar een serummonster geneem en die ekstraksieproses is tien maal herhaal (Tabel 5).

Tabel 5: Konsentrasies van die tien ekstraksies, gemiddeld, standaardafwyking en koëffisiënt van variasie

	Pristaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
1	0.01	0.10	60.14	17.63	1.01	0.29	0.02
2	0.02	0.11	61.89	17.97	0.96	0.29	0.02
3	0.01	0.11	63.90	18.20	1.06	0.28	0.02
4	0.01	0.11	63.05	18.44	1.20	0.29	0.02
5	0.01	0.11	60.06	17.39	1.06	0.29	0.02
6	0.01	0.10	58.53	17.09	1.10	0.29	0.02
7	0.01	0.10	63.14	18.08	1.05	0.29	0.02
8	0.01	0.09	53.98	15.44	0.97	0.29	0.02
9	0.01	0.11	61.72	17.85	1.05	0.29	0.02
10	0.01	0.13	54.17	15.84	1.14	0.29	0.02
Gemid	0.01	0.11	60.06	17.39	1.06	0.29	0.02
Std af	0.00	0.01	3.55	1.01	0.07	0.00	0.00
C.V. (%)	0.00	9.09	5.91	5.80	6.60	0.00	0.00

Tabel 6: 'n Vergelyking tussen die intra-analise herhaalbaarheid wat in hierdie studie verkry is en dit wat in die literatuur gegee word (Vreken *et al*, 1998).

Vetsuur	C.V. (%) (Vreken <i>et al</i>, 1998)	C.V. (%)
Pristaansuur	4.8	0.0
Fitaansuur	1.3	9.1
C22:0	1.2	5.9
C24:0	0.9	5.8
C26:0	1.1	6.6

5.1.4.2 Bespreking

Die intra-analise herhaalbaarheid is relatief goed (Tabel 5). Die variasie koëffisiënt stel die standaardafwyking voor as 'n persentasie van die gemiddeld en is vir al die vetsure kleiner as 10%, wat die norm in biologiese monsters is. Die intra-analise herhaalbaarheid is egter nie heeltemal so goed soos die waardes wat in die literatuur gegee word nie (Tabel 6).

5.1.4.3 Inter-analise herhaalbaarheid (herhaalbaarheid van die GC-MS analise)

Om die inter-analise herhaalbaarheid (herhaalbaarheid van die GC-MS analise) te bepaal, is een serummonster tien maal op die GC-MS gespuut. Die resultate wat verkry is, word in Tabel 7 gegee.

Tabel 7: Die gemiddelde konsentrasie en die koëffisiënt van variasie om die herhaalbaarheid van die GC-MS analise te toets.

	Pristaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
1	0.08	0.58	147.89	51.61	1.14	0.35	0.01
2	0.08	0.57	147.24	51.54	1.11	0.35	0.01
3	0.08	0.58	147.96	51.72	1.18	0.35	0.01
4	0.09	0.58	145.60	51.54	1.16	0.35	0.01
5	0.08	0.60	147.45	51.54	1.11	0.35	0.01
6	0.09	0.58	146.62	51.46	1.10	0.35	0.01
7	0.08	0.58	146.14	51.56	1.20	0.35	0.01
8	0.08	0.58	148.74	51.49	1.14	0.35	0.01
9	0.08	0.59	146.08	51.60	1.16	0.35	0.01
10	0.08	0.59	147.31	51.66	1.16	0.35	0.01
Gemid	0.08	0.58	147.10	51.57	1.15	0.35	0.01
Std af	0.00	0.01	0.98	0.08	0.03	0.00	0.00
%CV	0.00	1.70	0.67	0.15	2.60	0.00	0.00

Tabel 8: 'n Vergelyking tussen die inter-analise herhaalbaarheid wat in hierdie studie verkry is en dit wat in die literatuur gegee word (Vreken *et al*, 1998).

Vetsuur	C.V. (%) (Vreken <i>et al</i>, 1998)	C.V. (%)
Pristaansuur	4.8	0.0
Fitaansuur	4.8	1.7
C22:0	2.2	0.7
C24:0	3.1	0.2
C26:0	10.1	2.6

5.1.4.4 Bespreking

Die inter-analise herhaalbaarheid (herhaalbaarheid van die GC-MS analise) is relatief goed vir al die vetsure, soos aangetoon deur die koëffisiënt van variasie vir al die vetsure (Tabel 7). In vergelyking met die literatuurwaardes is die inter-analise herhaalbaarheid heelwat beter as wat in die literatuur aangetoon is.

5.1.5 Normaalwaardes en Normaalverspreiding

5.1.5.1 Normaalwaardes

Vir die bepaling van die normaalwaardes is daar 'n totaal van vyftig kontrolemonsters gebruik. Die resultate word aangetoon in tabel 9. In figuur 26 word 'n voorbeeld van 'n chromatogram van 'n kontrolemonster aangetoon.

Tabel 9: Konsentrasies van die vetsure, die C24:C22 en die C26:C22 verhoudings vir die vyftig kontrolemonsters, sowel as die mediaan- en standaardafwykings waaruit die normaalgrense bereken is.

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur (μmol)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
1	1.59	0.35	97.36	30.79	1.16	0.32	0.01
2	0.65	0.05	41.76	10.55	0.90	0.25	0.02
3	0.63	0.04	135.94	38.02	1.26	0.28	0.01
4	0.33	0.33	71.94	20.43	1.30	0.28	0.02
5	0.27	0.04	112.95	31.20	1.06	0.28	0.01
6	0.22	0.02	61.90	20.41	1.03	0.33	0.02
7	1.33	0.10	69.84	22.63	1.50	0.32	0.02
8	0.45	0.07	113.38	35.10	0.99	0.31	0.01
9	0.23	0.32	98.89	29.03	1.16	0.29	0.01
10	0.54	0.12	152.95	46.75	1.47	0.31	0.01
11	0.41	0.09	94.09	27.85	1.56	0.30	0.02
12	0.00	0.07	112.52	36.65	1.43	0.33	0.01
13	0.37	0.11	83.41	21.05	1.16	0.25	0.01

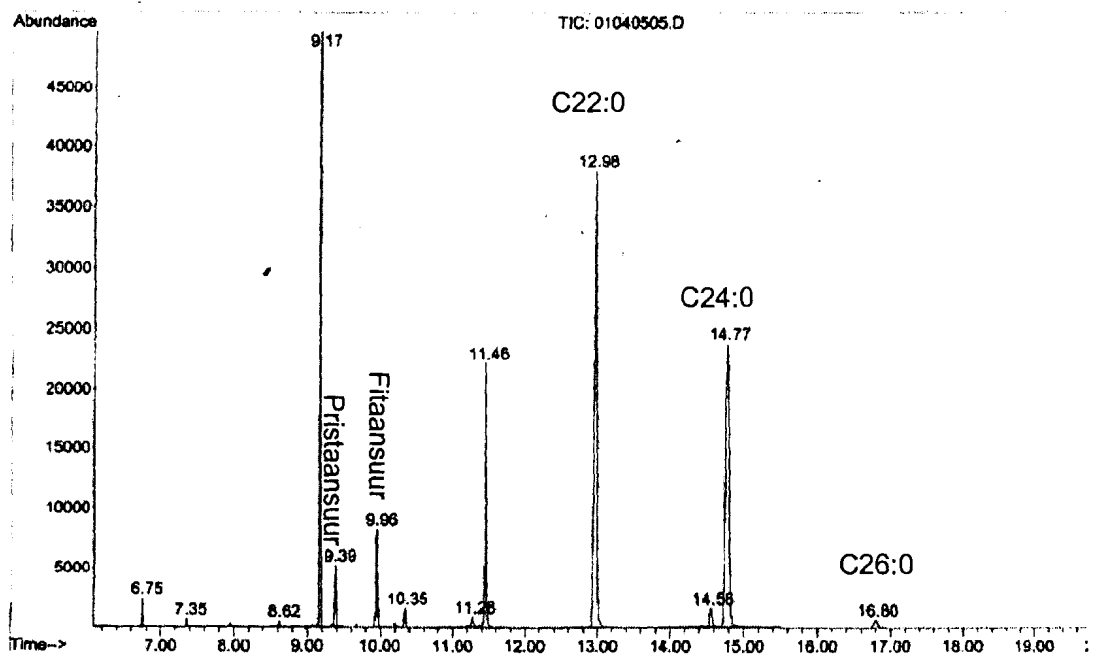
14	0.60	0.07	119.07	30.49	1.44	0.26	0.01
15	0.20	0.15	115.16	37.78	1.56	0.33	0.01
16	0.58	0.17	100.51	29.41	2.21	0.29	0.02
17	0.11	0.03	55.42	17.62	1.24	0.32	0.02
18	0.21	0.04	138.21	36.95	1.14	0.27	0.01
19	0.16	0.06	65.10	18.31	1.33	0.28	0.02
20	0.06	0.02	120.24	37.35	1.46	0.31	0.01
21	0.12	0.00	91.78	29.61	1.75	0.32	0.02
22	0.24	0.10	96.74	28.01	1.49	0.29	0.02
23	0.21	0.03	88.84	29.19	3.09	0.33	0.03
24	2.07	0.33	134.58	36.08	1.51	0.27	0.01
25	0.18	0.02	64.05	20.03	1.15	0.31	0.02
26	1.26	0.10	109.55	33.70	1.77	0.31	0.02
27	0.20	0.01	91.79	29.46	1.23	0.32	0.01
28	0.79	0.15	94.66	29.43	1.68	0.28	0.02
29	1.67	0.36	117.36	35.35	1.79	0.30	0.02
30	0.42	0.05	114.15	37.30	1.10	0.26	0.01
31	0.19	0.04	94.41	27.53	1.07	0.29	0.01
32	0.15	0.02	84.46	24.61	1.25	0.29	0.01
33	0.03	0.03	106.57	30.64	1.61	0.29	0.02
34	2.78	0.68	168.48	47.18	1.41	0.28	0.01
35	1.17	0.22	58.28	27.05	1.07	0.46	0.02
36	0.07	0.06	93.82	28.89	1.13	0.31	0.01
37	0.19	0.03	93.12	26.57	1.09	0.29	0.01
38	0.00	0.00	82.40	26.71	1.06	0.32	0.01
39	0.64	0.09	68.68	20.80	0.92	0.30	0.01
40	0.71	0.09	91.25	25.85	1.26	0.28	0.01
41	0.11	0.01	82.76	21.72	1.18	0.26	0.01
42	0.39	0.03	90.70	26.20	1.21	0.29	0.01
43	0.73	0.19	126.50	30.28	1.10	0.24	0.01
44	1.02	0.24	176.13	50.47	1.42	0.29	0.01
45	0.17	0.00	69.54	27.44	0.92	0.39	0.01
46	0.69	0.07	121.30	37.28	1.55	0.31	0.01
47	0.58	0.09	126.24	34.04	1.40	0.27	0.01
48	1.05	0.15	133.00	41.85	2.06	0.31	0.02
49	0.23	0.06	165.51	47.63	2.06	0.29	0.01
50	0.46	0.08	54.21	19.88	0.92	0.37	0.02
Mediaan	0.38	0.07	95.70	29.30	1.26	0.29	0.01
Std af	0.57	0.13	30.89	8.35	0.39	0.04	0.00

Tabel 10: Normaalgrense van die vetsure en vetsuurverhoudings, soos bereken vir 'n 95% vertrouensinterval. Die literatuurwaardes van Vreken *et al*, 1998, word ook aangetoon om 'n vergelyking te kan tref.

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur ($\mu\text{mol/l}$)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
Normaal- grense (n = 50)	0 – 1.5	0 – 0.3	33.9 – 157.5	12.6 – 46.0	0.5 – 2.1	0.2 – 0.4	0.00 – 0.02
Normaal- grense (n = 30) (Vreken <i>et al</i>, 1998)	0.3 – 11.5	0 – 1.5	41.1 – 90.3	37.4 – 74.9	0.6 – 1.2	0.7 – 1.0	0.01 – 0.02

5.1.5.2 Bespreking

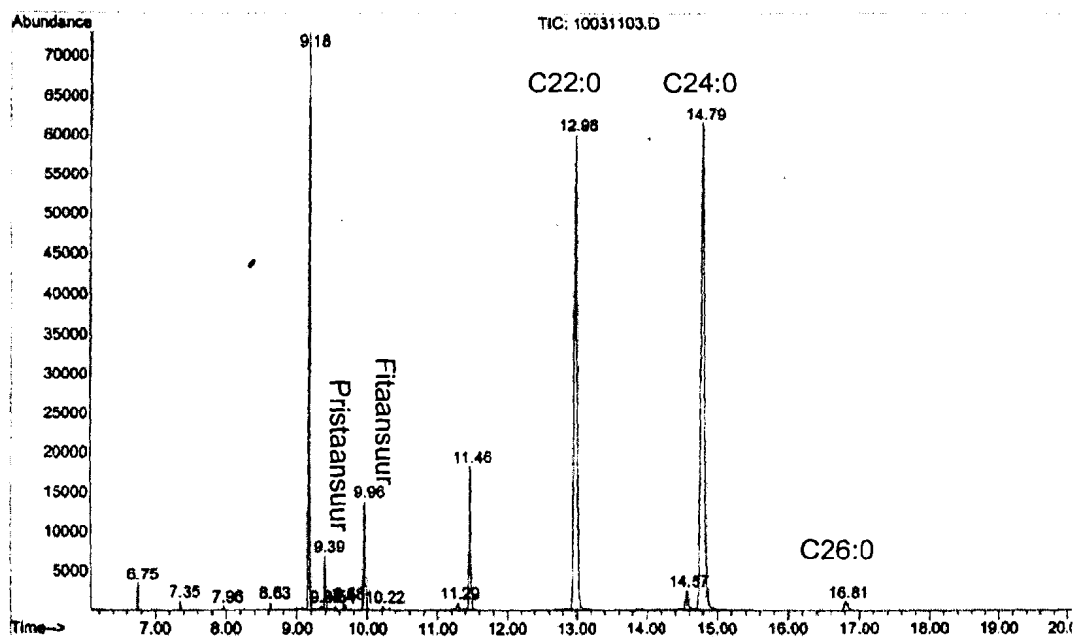
Die boonste normaalgrens van fitaansuur, pristaansuur, C24:0 en die C24:C22 verhouding is laer as die literatuurwaardes, terwyl die boonste normaalgrens van C22:0 en C26:0 hoër is. Die C26:C22 verhouding se normaalgrense kom weer ooreen met die literatuurwaardes. Hierdie verskille kan toegeskryf word aan die feit dat die normaalgrense in hierdie studie saamgestel is vir die Suid-Afrikaanse populasie, terwyl die literatuurwaardes saamgestel is vir die Nederlandse populasie. Die bepaling van die normaalgrense vir die Suid-Afrikaanse populasie was een van die hoofdoelwitte vir hierdie studie.



Figuur 26: Chromatogram van 'n kontrolemonster

5.1.5.3 Resultate van pasiënte met peroksisomale defekte:

Sewe pasiënte met moontlike peroksisomale defekte is gebruik om te vas te stel hoe die pasiëntwaardes (abnormale waardes) van die normaalwaardes verskil (Tabel 11). In figuur 27 word 'n voorbeeld van 'n chromatogram van 'n pasiënt met 'n peroksisomale defek gegee.



Figuur 27: Chromatogram van 'n pasiënt met 'n peroksisomale defek

Tabel 11: Die gemiddelde waardes, standaardafwyking en die 95% vertrouensintervalgrense wat verkry is vir die 7 individue met moontlike peroksisomale defekte (die waardes wat vet gedruk is, dui op verhoogde waardes volgens die normaalgrense (Tabel 10) wat in hierdie studie bepaal is).

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur (μmol)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
1	0.03	0.06	32.12	13.72	1.44	0.43	0.04
2	0.02	0.01	23.99	21.00	7.25	0.88	0.30
3	0.57	0.17	72.86	37.98	2.86	0.52	0.04
4	0.20	0.04	69.03	38.51	3.25	0.56	0.05
5	0.91	0.17	94.12	47.82	2.19	0.51	0.02
6	0.22	0.08	62.22	34.37	2.72	0.55	0.04
7	0.18	0.11	30.19	19.25	6.70	0.64	0.22
Gemid	0.30	0.09	54.93	30.38	3.77	0.58	0.10
Std af	0.32	0.06	26.45	12.47	2.27	0.14	0.11
95% vertrouens- intervalgrense	0 - 0.9	0 - 0.2	2.0 - 107.8	5.44 - 55.32	0 - 8.31	0.3 - 0.87	0 - 0.33

5.1.5.4 Bespreking

Die gemiddelde konsentrasie van fitaansuur, pristaansuur, C22:0, C24:0 van al hierdie pasiënte is binne die normaalgrense (Tabel 10). Die gemiddelde konsentrasie van C26:0, die C24:C22 verhouding en die C26:C22 verhouding val egter buite die normaalgrens. Vir pasiënt 1 is daar slegs 'n matige verhoging in die C26:C22 verhouding. Hierdie pasiënt is by 'n vroeër geleentheid gediagnoseer met X-ALD. Daar was ongelukkig nie meer van die monster beskikbaar waarop die diagnose gemaak is nie. Die monster wat hier ingesluit is, is geneem ná behandeling met Lorenzo se olie en derhalwe die rede waarom slegs die C26:C22 verhouding effens verhoog is. Pasiënt 2 toon 'n groot verhoging in die C26:0 konsentrasie, sowel as die C24:C22 en C26:C22 verhouding. Die kliniese beeld sluit lewerbetrokkenheid, groeivertraging, doofheid, hipotonie en dismorfiese kenmerke in. Die kliniese beeld pas in by die Zellwegerspektrum, maar die resultate toon nie 'n verhoging in die

fitaansuurkonsentrasie nie en daarom is 'n definitiewe diagnose nog nie gemaak nie. Pasiënt 3 se C26:0 konsentrasie en die C24:C22 verhouding is matig verhoog. Daar is ongelukkig geen kliniese inligting van hierdie pasiënt beskikbaar nie. Herhaalmonsters word nog verwag. Pasiënt 4 toon ook 'n verhoging in die C26:0 konsentrasie en die C24:C22 en C26:C22 verhoudings. Daar is geen kliniese inligting van hierdie pasiënt beskikbaar nie en daar word ook nog vir 'n opvolgmonster gewag. Pasiënt 5 toon 'n matige verhoging in die C24:0, C26:0 konsentrasies en die C24:C22 verhouding, maar die C26:C22 verhouding is binne die normaalgrense. Hierdie pasiënt is in Nederland gediagnoseer met X-ALD. Die monster wat hier geanaliseer is, was 'n opvolgmonster om die effek van behandeling te monitor. Pasiënt 6 toon ook 'n matige verhoging in die C26:0 konsentrasie en die C24:C22 en C26:C22 verhoudings. Hierdie pasiënt is ook in Nederland gediagnoseer met adrenomeïelopatie en die opvolgmonster wat hier geanaliseer is, is gedoen om die effek van behandeling met statiene te monitor. Pasiënt 7 toon 'n groot verhoging in die C26:0 konsentrasie sowel as die C24:C22 verhouding en die C26:C22 verhoudings. Hierdie pasiënt toon dismorfiese kenmerke, hipotonie, nistagmus en ruwe gesigseienskappe wat inskakel by die Zellwegerspektrum. Aangesien die fitaansuurvlakke egter binne die normaalgrense is, is die diagnose nog nie finaal nie. Daar word nog gewag op herhaalmonsters van hierdie pasiënt.

5.1.5.5 Normaalverspreiding

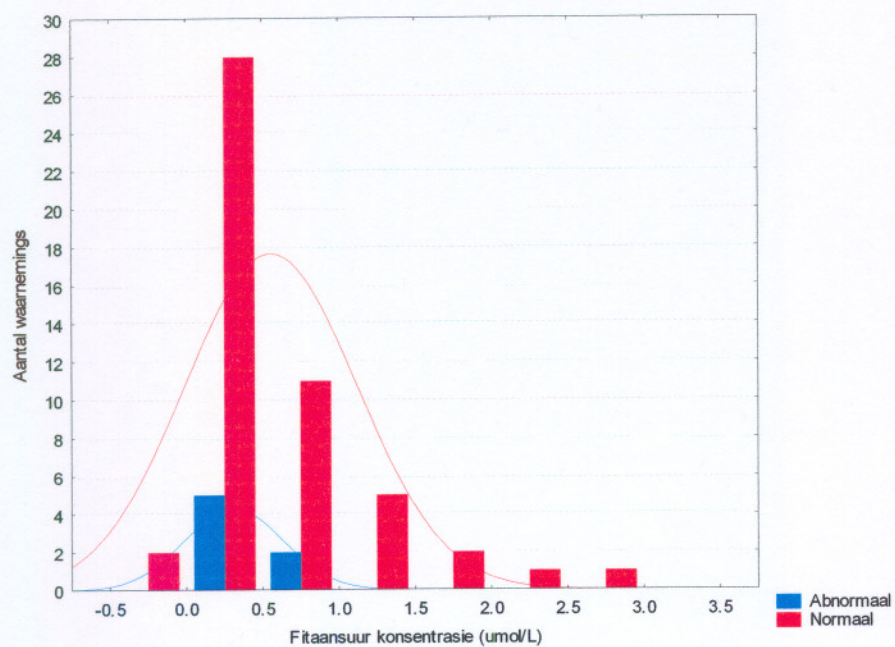
Die vyftig kontrolemonsters wat gebruik is om die normaalgrense te bepaal, is ook gebruik om die normaalverspreiding van elke vetsuur en die vetsuurverhoudings te bepaal. Die sewe pasiënte se waardes is ook hierby ingesluit. Die Shapiro-Wilk toets word gebruik om normaliteit te bepaal, 'n W-waarde > 0.05 beteken dat die data normaal versprei is. Indien die verspreiding normaal is, kan die T-toets gedoen word om aan te toon of die pasiëntwaardes statisties betekenisvol verskil van die kontrolemonsters. Die resultate word aangetoon in Tabel 12 en Figure 28 tot 34.

Tabel 12: Resultate wat verkry is in die Shapiro-Wilk toets vir normaalverspreiding en die T-toets om aan te toon of die pasiëntgroep statisties betekenisvol van die kontrolegroep verskil.

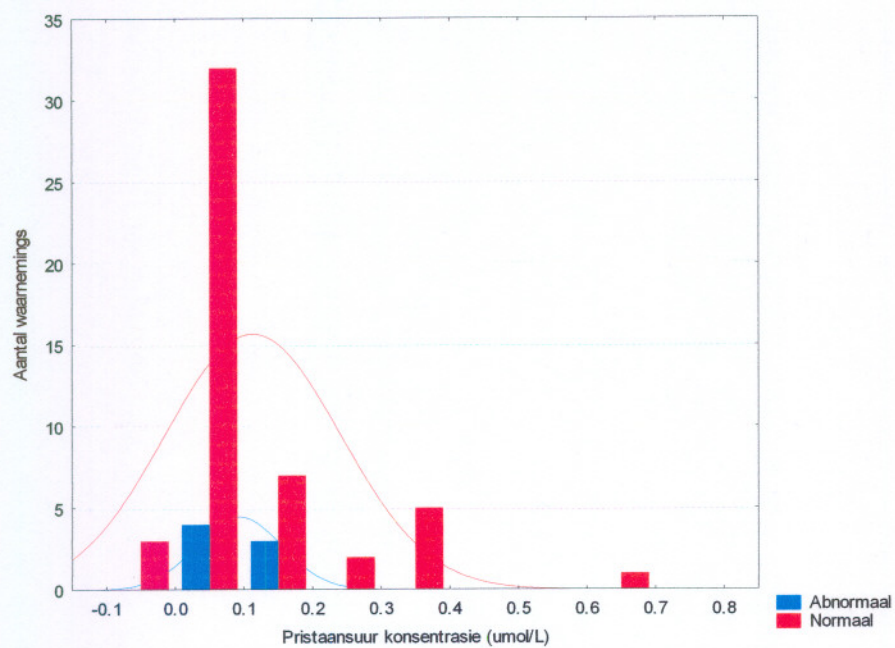
Vetsuur	T-Toets	Shapiro-Wilk toets	
		Kontrole	Pasiënt
Fitaansuur	P = 0.13	W = 0.79	W = 0.83
Pristaansuur	P = 0.34	W = 0.74	W = 0.93
C22:0	P = 0.00	W = 0.97	W = 0.91
C24:0	P = 0.47	W = 0.97	W = 0.93
C26:0	P = 0.00	W = 0.84	W = 0.83
C24/C22	P = 0.00	W = 0.85	W = 0.85
C26/C22	P = 0.00	W = 0.89	W = 0.71

5.1.5.6 Bespreking

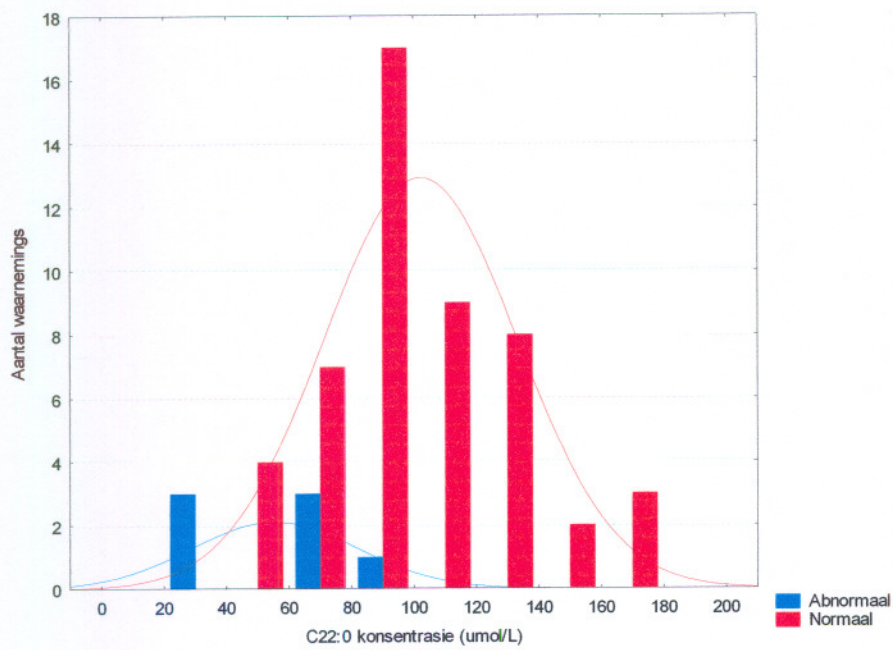
Hierdie resultate toon aan dat die vetsure en die vetsuurverhoudings in beide die kontrole- en pasiëntgroep wel normaal versprei is, omdat die Shapiro-Wilk toets in al die gevalle 'n waarde gee wat groter is as 0.05 (Tabel 12 en Figure 28 tot 34). Omdat al hierdie data normaal versprei is, kan die t-toets gedoen word om aan te toon of die kontrolegroep statisties betekenisvol van die pasiëntgroep verskil. Die p-waarde moet kleiner wees as 0.05 vir die data om statisties betekenisvol van mekaar te verskil. In die geval van fitaansuur en pristaansuur is daar nie 'n statisties betekenisvolle verskil tussen die kontrolegroep en die pasiëntgroep nie. Dit was egter te wagte omdat die waardes van fitaansuur en pristaansuur in die pasiëntgroep nie abnormaal was nie, maar steeds binne die normaalgrense. Vir die C24:0 konsentrasie is daar ook nie 'n statisties betekenisvolle verskil tussen die kontrole- en pasiënt groep nie, maar daar is wel 'n statisties betekenisvolle verskil tussen waardes van C22:0 en C26:0 in die kontrole- en pasiëntgroep. Die belangrikste is egter die feit dat daar wel statisties betekenisvolle verskille is tussen die kontrolegroep en die pasiëntgroep se C24:C22- en C26:C22 verhoudings, omdat dit die verhoudings is wat bepaal of daar 'n abnormaliteit is of nie.



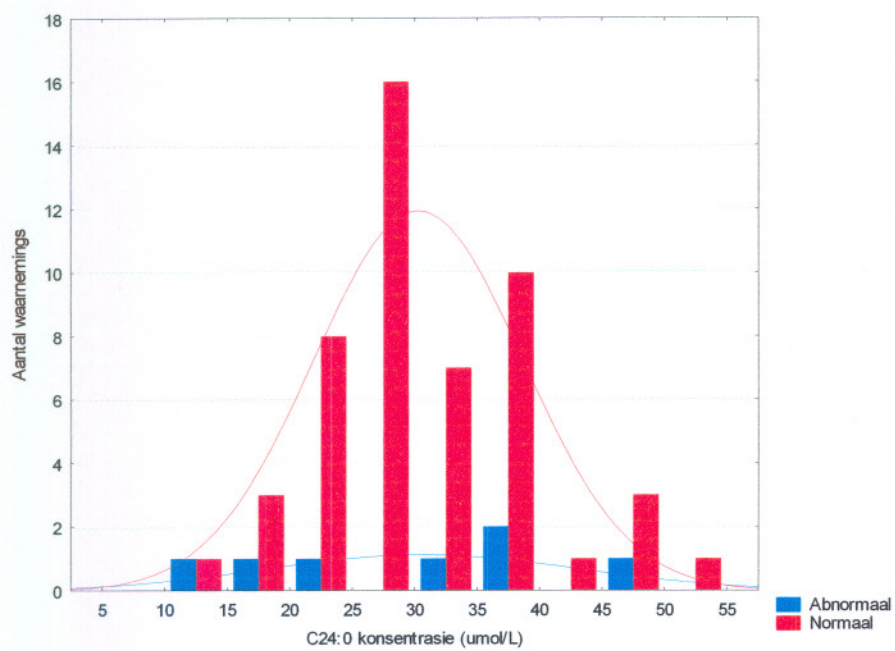
Figuur 28: Die normaal verspreiding van fitaansuur.



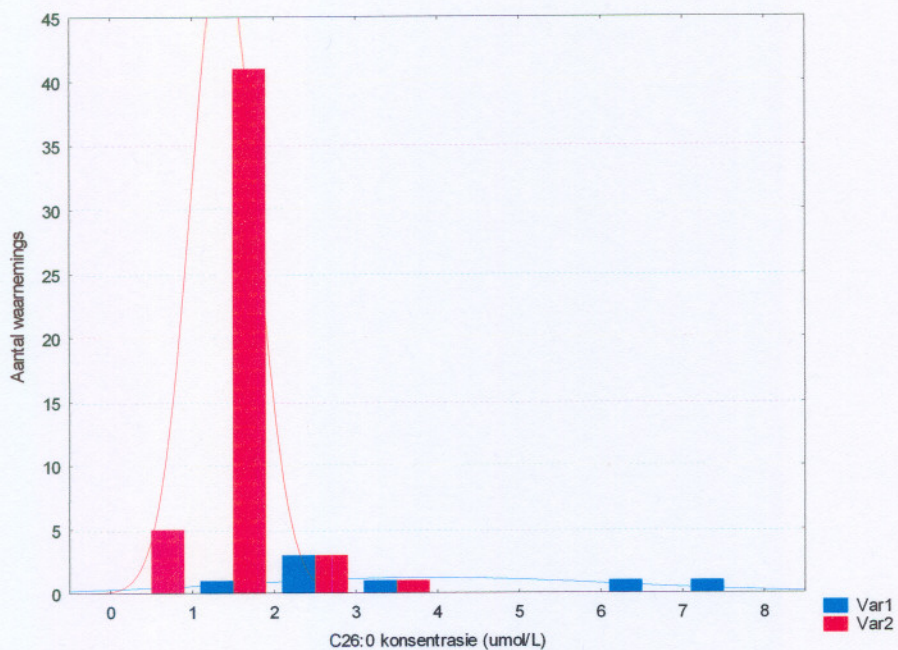
Figuur 29: Die normaalverspreiding van pristaansuur.



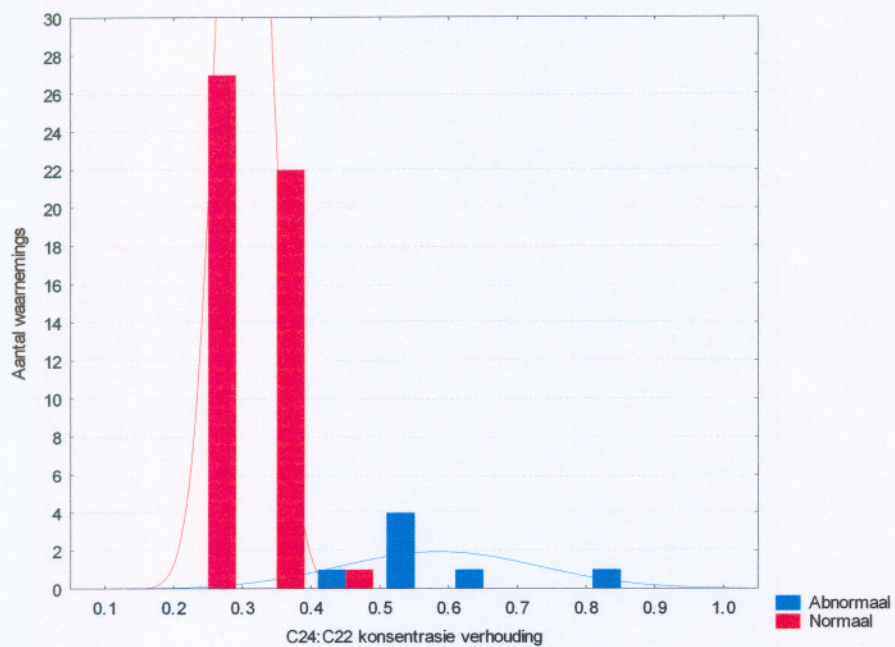
Figuur 30: Die normaalverspreiding van C22:0.



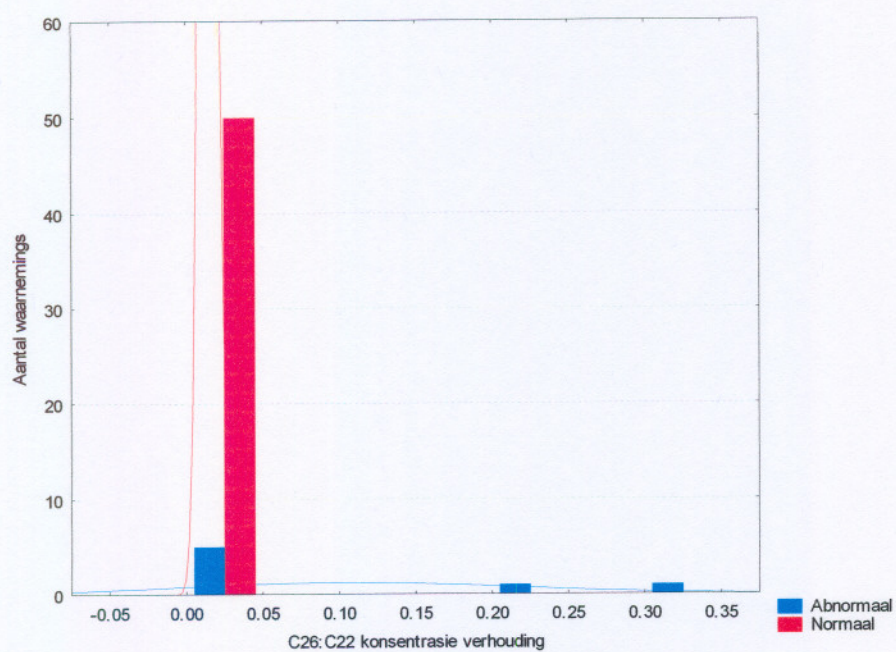
Figuur 31: Die normaalverspreiding van C24:0



Figuur 32: Die normaal verspreiding van C26:0.



Figuur 33: Die normaalverspreiding van die C24:C22 verhouding



Figuur 34: Die normaalverspreiding van die C26:C22 verhouding.

HOOFSTUK 6

SIFTINGSMETABOLIE TE VIR PEROKSISOMALE DEFЕКTE

6.1 Organiese suur profiele van pasiënte wat reeds met peroksisomale defekte gediagnoseer is

Ons het reeds sewe pasiënte gediagnoseer wat moontlike peroksisomale defekte het. Ongelukkig was daar van net drie pasiënte uriene beskikbaar om die organiese suur analise te doen. Die resultate word in die volgende drie gevallestudies bespreek.

6.1.1 Gevallestudie 1

Die pasiënt is 'n veertigjarige man, wat in 1998 deur die *Laboratory of Genetic Metabolic Diseases* (Amsterdam, Nederland) gediagnoseer is met adrenomeïelopatie. Die monster wat plaaslik geanaliseer is, was hoofsaaklik om die invloed van behandeling met statiene op die pasiënt te monitor. Uit die resultate (Tabel 13) is dit duidelik dat die C26:0 vetsuur sowel as die C24:C22 verhouding en die C26:C22 verhouding verhoog is.

Die organiese suur profiel van hierdie pasiënt is ondersoek om te kyk of die volgende organiese sure teenwoordig was: 3-OH-bottersuur, 2-OH-isovaleriaansuur, adapiensuur, suberiensuur, azelaïsesuur, pimeliesesuur, sebasiensuur, 2-OH-sebasiensuur, 3-OH-sebasiensuur, 4-OH-feniellaktaat, oktenedioësuur. Slegs enkele van hierdie organiese sure was teenwoordig (Tabel 14). Alhoewel 2-OH-isovaleriaansuur, pimeliesesuur en 3-OH-sebasiensuur nie in normale uriene teenwoordig is nie, was die waardes nie hoog genoeg om op 'n ernstige abnormaliteit te dui nie. Die konsentrasies van adapiensuur en 4-OH-feniellaktaat was binne die normaalgrense.

Tabel 13: Die BLKVS/VLCFA resultate wat verkry is vir die pasiënt in gevallestudie 1

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur (μmol)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
Normaal- grense (n = 50)	0 – 1.5	0 – 0.3	33.9 – 157.5	12.6 – 46.0	0.5 – 2.1	0.2 – 0.4	0.00 – 0.02
Gevalle- studie 1	0.22	0.08	62.22	34.37	2.72	0.55	0.04

Tabel 14: Die organiese suur resultate van die pasiënt in gevallestudie 1

Organiese suur	Konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	Normaalwaardes (mmol/mol kreatinien)
2-OH-isovaleriaansuur	0.56	Nie teenwoordig nie
Adiapiensuur	0.53	0 – 35
Pimeliesesuur	0.65	Nie teenwoordig nie
4-OH-feniellaktaat	0.86	0 – 2.6
3-OH-sebasiensuur	0.47	Nie teenwoordig nie

6.1.2 Gevallestudie 2

Die pasiënt was 'n drie maande oue dogtertjie by tye van ondersoek. Sy presenteer met lewerabnormaliteite en geelsug, vertraagde groei, doofheid, hipotonie, nistagmus en kliniese sepsis. Sy het ook dismorfiese kenmerke wat inpas by die Zellwegerspektrum. Die resultate van die BLKVS/VLCFA analise word in Tabel 15 opgesom. Hierdie pasiënt toon 'n groot verhoging in die C26:0 konsentrasie, sowel as die C24:C22 en C26:C2 verhouding. Die fitaansuurvlakke is egter normaal en daarom is die diagnose as deel van die Zellwegerspektrum nog nie finaal nie, aangesien daar nog gewag word op 'n herhaalmonster vir bevestiging.

Tabel 15: Die BLKVS/VLCFA resultate van die pasiënt in gevallestudie 2

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
Normaal- grense (n = 50)	0 – 1.5	0 – 0.3	33.9 – 157.5	12.6 – 46.0	0.5 – 2.1	0.2 – 0.4	0.00 – 0.02
Gevalle studie 2	0.02	0.01	23.99	21.00	7.25	0.88	0.30

Die organiese suurprofiel van hierdie pasiënt is ondersoek om te kyk of die volgende organiese sure teenwoordig was: 3-OH-bottersuur, 2-OH-isovaleriaansuur, adipiensuur, suberiensuur, azelaïsesuur, pimeliesesuur, sebasiensuur, 2-OH-sebasiensuur, 3-OH-sebasiensuur, 4-OH-feniellaktaat, oktenedioësuur (Tabel 16).

Tabel 16: Die organiese suur resultate van die pasiënt in gevallestudie 2

Organiese suur	Konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	Normaalwaardes (mmol/mol kreatinien)
3-OH-bottersuur	32.84	0 – 9
2-OH-isovaleriaansuur	18.46	0 – 3
Adipiensuur	10.05	0 – 32
Pimeliesesuur	3.41	Nie teenwoordig nie
Oktenedioësuur	15.73 (mg/g kreatinien)	0 – 3 (mg/g kreatinien)
Suberiensuur	9.88	0 – 20
Azelaïsesuur	3.39	0 – 4
Sebasiensuur	6.75	0 – 57
4-OH-feniellaktaat	89.06	0 – 48
3-OH-sebasiensuur	14.28	Nie teenwoordig nie
2-OH-sebasiensuur	13.53	Nie teenwoordig nie
Sebasiensuur:Adipiensuur	0.67	0.2

Al hierdie organiese sure is in die uriene teenwoordig. Adiapiensuur, suberiensuur, azelaïsesuur en sebasiensuur is almal binne die normaalgrense. Pimeliesesuur, 3-OH-sebasiensuur en 2-OH-sebasiensuur wat nie in normale uriene teenwoordig is nie, kom wel voor. Die 3-OH-bottersuur, 2-OH-isovaleriaansuur, oktenedioësuur, 4-OH-feniellaktaat sowel as die sebasiesuur:adiapiensuur verhouding is verhoog (Tabel 16).

6.1.3 Gevallestudie 3

Hierdie pasiënt was 'n maand oue seuntjie by tye van ondersoek en toon kliniese simptome soos dismorfiese eienskappe, hipotonie, nistagmus en ruwe gesigseienskappe wat inskakel by die Zellwegerspektrum, maar omdat die fitaansuurvlakke binne die normaalgrense is, is die diagnose nog nie finaal nie. Daar word nog gewag op herhaalmonsters van hierdie pasiënt. Biochemies is daar 'n groot verhoging in die C26:0 konsentrasie sowel as die C24:C22 verhouding en die C26:C22 verhoudings (Tabel 17).

Tabel 17: Die BLKVS/LCFA resultate vir die pasiënt in gevallestudie 3

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur (μmol)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
Normaal- grense (n = 50)	0 – 1.5	0 – 0.3	33.9 – 157.5	12.6 – 46.0	0.5 – 2.1	0.2 – 0.4	0.00 – 0.02
Gevalle- studie 3	0.18	0.11	30.19	19.25	6.70	0.64	0.22

Die organiese suurprofiel van hierdie pasiënt is ondersoek om te kyk of die volgende organiese sure teenwoordig was: 3-OH-bottersuur, 2-OH-isovaleriaansuur, adiapiensuur, suberiensuur, azelaïsesuur, pimeliesesuur, sebasiensuur, 2-OH-sebasiensuur, 3-OH-sebasiensuur, 4-OH-feniellaktaat, oktenedioësuur. Daar was twee urienmonsters beskikbaar vir hierdie pasiënt en die resultate word aangetoon in Tabel 18 en 19.

Tabel 18: Resultate van die eerste organiese suur analise van die pasiënt in gevallestudie 3

Organiese suur	Konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	Normaalwaardes (mmol/mol kreatinien)
2-OH-isovaleriaansuur	8.9	0 – 3
Adiapiensuur	7.5	0 – 32
Pimeliesesuur	3.4	Nie teenwoordig nie
Oktenedioësuur	9.2 (mg/g kreatinien)	0 – 3 (mg/g kreatinien)
Azelaïsesuur	0.3	0 – 4
Sebasiensuur	25.7	0 – 57
4-OH-feniellaktaat	19.6	0 – 48
3-OH-sebasiensuur	30.1	Nie teenwoordig nie
2-OH-sebasiensuur	1.3	Nie teenwoordig nie
Sebasiensuur:Adiapiensuur	3.4	0.2

Tabel 19: Resultate van die tweede organiese suur analise van die pasiënt in gevallestudie 3

Organiese suur	Konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	Normaalwaardes (mmol/mol kreatinien)
3-OH-bottersuur	0.4	0 – 9
2-OH-isovaleriaansuur	3.6	0 – 3
Adiapiensuur	6.9	0 – 32
Pimeliesesuur	6.1	Nie teenwoordig nie
Oktenedioësuur	6.91 (mg/g kreatinien)	0 – 3 (mg/g kreatinien)
Azelaïsesuur	2.8	0 – 4
Sebasiensuur	1.5	0 – 57
4-OH-feniellaktaat	15.1	0 – 48
3-OH-sebasiensuur	12.4	Nie teenwoordig nie
2-OH-sebasiensuur	16.2	Nie teenwoordig nie
Sebasiensuur:Adiapiensuur	0.2	0.2

In die eerste organiese suur analise is 2-OH-isovaleriaansuur, oktenedioësuur en die sebasiansuur:adipiensuur verhouding verhoog. Pimeliesesuur, 3-OH-sebasiansuur en 2-OH-sebasiansuur wat normaalweg nie teenwoordig is nie, kom ook voor.

In die tweede organiese suur profiel van hierdie pasiënt is daar verhoogde 2-OH-isovaleriaansuur en oktenedioësuur. Pimeliesesuur, 3-OH-sebasiansuur en 2-OH-sebasiansuur, wat nie normaalweg teenwoordig is in normale uriene nie, kom ook verhoog voor. Die sebasiesuur:adipiensuur verhouding is ook verhoog.

6.1.4 Bespreking

Die pasiënt wat in gevallestudie 1 ondersoek is, is gediagnoseer met adrenomeïelopatie en die organiese suur profiel toon nie werklik enige abnormaliteite nie, terwyl die pasiënte wat in gevallestudie 2 en 3 bespreek is, wel abnormaliteite toon. By hierdie twee pasiënte word 'n PBD vermoed, omdat die kliniese beeld inpas by die Zellwegerspektrum. Die organiese suur profile van hierdie twee pasiënte toon verder die verhoogde teenwoordigheid van dikarboksielsure en ander organiese sure wat aanduidend van PBD kan wees. Die sebasiesuur:adipiensuur verhouding is ook in beide hierdie pasiënte met moontlike PBD verhoog.

6.2 Die ondersoek van organiese suur profile in ander pasiënte

'n Totaal van 1 000 pasiënte se organiese suur profile is ondersoek vir die teenwoordigheid van die volgende organiese sure: 3-OH-bottersuur, 2-OH-isovaleriaansuur, adapiensuur, suberiensuur, azelaïsesuur, pimeliesesuur, sebasiansuur, 2-OH-sebasiansuur, 3-OH-sebasiansuur, 4-OH-feniellaktaat en oktenedioësuur. Die meerderheid van hierdie organiese sure is teenwoordig in 300 (30%) van die pasiënte se profile. Hierdie pasiënte sluit normale individue, individue wat valproaat en ander medikasie gebruik, galaktosemiepasiënte, glikogeenstoringsdefekte pasiënte, beta-oksidase defekte pasiënte (waarvan die spesifieke defek nog nie vir die betrokke pasiënt bekend is nie), mitochondriale defekte pasiënte, kortkettingasiel-KoA-dehidrogenase defekte pasiënte (KKAD/SCAD), mediumkettingasiel-KoA-dehidrogenase defekte pasiënte (MKAD/MCAD), langkettingasiel-KoA-dehidrogenase defekte pasiënte

(LKAD/LCAD), langketting-hidroksi-asiel-KoA-dehidrogenase defekte pasiënte (LKHAD/LCHAD) en karnitienpalmitoïeltransferase 1 defekte pasiënte in. Vir die pasiënte wat in die volgende drie gevallestudies bespreek word, is nog nie finale diagnoses gemaak nie en die BLKVS/VLCFA analise is uitgevoer om peroksisomale defekte aan te toon of uit te sluit.

6.2.1 Gevallestudie 4

Die pasiënt was 'n maandoue dogtertjie by tye van ondersoek, wat die volgende kliniese beeld toon: hipoglisemie sonder asidose, die vel is nie ferm nie, mikrognasia en sy kan nie haar arms reguit maak nie. Die moeder het Sotosindroom (serebellêre gigantisme).

Die organiese suurprofiel is ondersoek vir die teenwoordigheid van die volgende metaboliete: 3-OH-bottersuur, 2-OH-isovaleriaansuur, adipiensuur, suberiensuur, azelaïsesuur, pimeliesesuur, sebasiensuur, 2-OH-sebasiensuur, 3-OH-sebasiensuur, 4-OH-feniellaktaat, oktenedioësuur. Die resultate word aangetoon in Tabel 20.

Tabel 20: Die resultate van die organiese suur analise vir die pasiënt in gevallestudie 4

Organiese suur	Konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	Normaalwaardes (mmol/mol kreatinien)
3-OH-bottersuur	3.4	0 – 9
Adipiensuur	153.15	0 – 32
Pimeliesesuur	20.87	Nie teenwoordig nie
Oktenedioësuur	50.89 (mg/g kreatinien)	0 – 3 (mg/g kreatinien)
Suberiensuur	92.56	0 – 20
Azelaïsesuur	12.39	0 – 4
Sebasiensuur	116.63	0 – 57
4-OH-feniellaktaat	435.99	0 – 48
2-OH-sebasiensuur	17.82	Nie teenwoordig nie
3-OH-sebasiensuur	16.4	Nie teenwoordig nie
Sebasiensuur:Adipiensuur	0.76	0.2

Al die organiese sure, behalwe 3-OH-bottersuur, kom voor in verhoogde konsentrasies in die uriene (Tabel 13). Die sebiensuur:adipiensuur verhouding is ook verhoog. Die BLKVS/VLCFA analise is gedoen en die resultate word in Tabel 21 weergegee.

Tabel 21: Die resultate wat verkry is vir die BLKVS/VLCFA analise van die pasiënt in gevallestudie 4.

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur (μmol)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
Normaal- grense (n = 50)	0 – 1.5	0 – 0.3	33.9 – 157.5	12.6 – 46.0	0.5 – 2.1	0.2 – 0.4	0.00 – 0.02
Gevalle- studie 4	0.00	0.00	53.02	17.18	0.88	0.32	0.02

Die vetsuurkonsentrasies sowel as die vetsuurverhoudings is binne die normaalgrense; derhalwe is die moontlikheid van 'n peroksisomale defek uitgesluit in hierdie pasiënt.

6.2.2 Gevallestudie 5

Die pasiënt is 'n seuntjie van tien maande. Hy is hipotonies, toon makrosefalie, kry gastro-epilepsie en het asidose, sonder ketose. Beide die organiese suur analise en die BLKVS/VLCFA analyses is uitgevoer en die resultate word in Tabel 22 en 23 weergegee.

Tabel 22: Die organiese sure wat in die uriene teenwoordig is van die pasiënt in gevallestudie 5

Organiese suur	Konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	Normaalwaardes (mmol/mol kreatinien)
3-OH-bottersuur	34.25	0 – 11.1
Adiensiensuur	9.05	0 – 34.3
Pimeliesesuur	3.06	Nie teenwoordig nie
Suberiensuur	4.34	0 – 10.1
Azelaïsesuur	4.63	0 – 15.4
Sebasiensuur	1.64	0 - 1.4
4-OH-feniellaktaat	5.21	0 – 3.1
2-OH-sebasiensuur	1.39	Nie teenwoordig nie
3-OH-sebasiensuur	5.25	Nie teenwoordig nie
Sebasiensuur:Adiensiensuur	0.18	0.2

Hierdie resultate dui nie op ernstige abnormaliteite nie. Slegs die 3-OH-bottersuur is matig verhoog. Sebasiensuur en 4-OH-feniellaktaat is gering verhoog en pimeliesesuur, 2-OH-sebasiensuur en 3-OH-sebasiensuur, is wel teenwoordig. Al die ander organiese sure is binne die normaalgrense en die sebasiensuur:adiensiensuur verhouding is ook nie verhoog nie (Tabel 22).

Tabel 23: Die BLKVS/LCFA resultate van die pasiënt in gevallestudie 5

	Fitaansuur (μmol/L)	Pristaansuur (μmol)	C22:0 (μmol/L)	C24:0 (μmol/L)	C26:0 (μmol/L)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
Normaal- grense (n = 50)	0 – 1.5	0 – 0.3	33.9 – 157.5	12.6 – 46.0	0.5 – 2.1	0.2 – 0.4	0.00 – 0.02
Gevalle- studie 5	0.00	0.00	85.89	21.00	1.08	0.24	0.01

Hierdie resultate toon normale konsentrasies van al die vetsure, sowel as die vetsuurverhoudings, wat 'n peroksisomale defek in hierdie geval, uitsluit.

6.2.3 Gevallestudie 6

Die pasiënt was 'n tweejarige seuntjie by tye van ondersoek, wat progressiewe neurologiese afwykings en verstandelike gestremdheid toon. Hierdie pasiënt het ook weerstandige konvulsies en herhaalde episodes van status epilepsie. Die organiese suur en BLKVS/VLCFA resultate word in Tabel 24 en Tabel 25 aangetoon.

Tabel 24: Die organiese suur resultate van die pasiënt in gevallestudie 6.

Organiese suur	Konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	Normaalwaardes (mmol/mol kreatinien)
3-OH-bottersuur	102.86	0 – 11.1
2-OH-isovaleriaansuur	0.33	0 – 1.3
Adiapiensuur	2.81	0 – 34.3
Pimeliesesuur	0.78	Nie teenwoordig nie
Oktenedioësuur	1.96 (mg/g kreatinien)	0 – 8 (mg/g kreatinien)
Suberiensuur	1.00	0 – 10.1
3-OH-sebasiensuur	0.53	Nie teenwoordig nie

Nie al die organiese sure waarna gekyk is, is teenwoordig in hierdie pasiënt se uriene nie. Al die organiese sure wat wel teenwoordig is, val binne die normaalgrense, behalwe 3-OH-bottersuur wat verhoog is en pimeliesesuur en 3-OH-sebasiensuur wat gewoonlik nie teenwoordig is nie (Tabel 19).

Tabel 25: Die BLKVS/VLCFA resultate van die pasiënt in gevallestudie 6.

	Fitaansuur ($\mu\text{mol/L}$)	Pristaansuur (μmol)	C22:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C26:0 ($\mu\text{mol/L}$)	C24:C22 verhouding	C26:C22 verhouding
Normaal- grense (n = 50)	0 – 1.5	0 – 0.3	33.9 – 157.5	12.6 – 46.0	0.5 – 2.1	0.2 – 0.4	0.00 – 0.02
Gevalle- studie 6	0.92	0.15	107.16	31.77	0.84	0.30	0.01

Die resultate toon geen abnormaliteite ten opsigte van die vetsuurkonsentrasies of die vetsuurverhoudings nie en toon dus aan dat daar nie 'n peroksisomale defek vermoed word nie (Tabel 20).

6.2.4 Bespreking

Uit gevallestudies 4, 5 en 6 is dit duidelik dat daar verhoogde dikarboksielsure en ander organiese sure teenwoordig is, maar dat die BLKVS/VLCFA resultate normaal is vir al die pasiënte. Verhogings in hierdie organiese sure dui dus nie noodwendig op peroksisomale defekte nie, maar dit kan wel 'n aanduiding gee van 'n moontlike PBD. 'n Verhoging in die sebasiensuur:adipiensuur verhouding is ook nie uniek in peroksisomale defekte nie, omdat dit ook hier verhoog voorkom by die pasiënt in gevallestudie 4.

HOOFSTUK 7

GEVOLGTREKKING

7.1 Standaardisering van die stabiele isotoopverdunningsmetode vir die bepaling van baie-langkettingvetsure (BLKVS/VLCFA), fitaansuur en pristaansuur

'n Vinnige en sensitiewe metode vir die analisering van baie-langkettingvetsure, fitaansuur en pristaansuur word vereis vir die opsporing van pasiënte wat moontlik peroksisomale defekte het. Tydens hierdie studie is so 'n metode geïmplementeer en gestandaardiseer vir die Suid-Afrikaanse populasie.

Lae konsentrasies en hoë molekulêre massas van hierdie verbindings dra by tot die kompleksiteit van hierdie analise. Die gebruik van stabiele isotope as interne standaarde vir elk van die betrokke vetsure, verseker die akkurate kwantifisering van hierdie vetsure in pasiëntmonsters.

Daar is 'n baie goeie liniêre verwantskap tussen die konsentrasies van elk van die vetsure en die oppervlakte onder die pieke op die chromatogram. Dit toon aan dat die oppervlakte onder die pieke van die vetsure direk eweredig is aan die konsentrasies van die vetsure. Die kwantifiseringslimiete van hierdie metode laat ook toe dat konsentrasies laer as die normaalwaardes en hoër as die verhoogde waardes gemeet kan word. Dit verseker dat peroksisomale defekte wel met hierdie metode opgespoor kan word.

Die herwinning van die vetsure, die herhaalbaarheid van die ekstraksieproses en die herhaalbaarheid van die GC-MS analise vir al die vetsure vergelyk oor die algemeen goed met literatuurwaardes. Dit dui op goeie presisie en akkuraatheid.

Omdat die normaalwaardes van verskillende populasies dikwels van mekaar verskil, was een van die belangrikste doelstellings om die normaalwaardes van die Suid-

Afrikaanse populasie te bepaal. Al die vetsure is normaal versprei en daar is 'n statisties betekenisvolle verskil tussen die kontrole- en pasiëntmonsters.

Omdat die bepaling van baie-langkettingvetsure die aanbevole eerste toets is vir die diagnosering van pasiënte met verwagte peroksisomale defekte, kan hierdie pasiënte dus nou wel in Suid-Afrika gediagnoseer word.

7.2 Siftingsmetaboliete vir peroksisomale defekte

Die gebrek aan 'n eenvoudige siftingstoets vir peroksisomale defekte dra daartoe by dat baie defekte in die metabolisme nie gediagnoseer word nie. Veral in Suid-Afrika waar die kliniese beeld wat daarmee gepaard gaan nie altyd bekend is nie, kan die defekte ongediagnoseerd bly.

Alhoewel die kliniese beeld steeds die beste aanduiding gee van moontlike peroksisomale defekte, kan die volgende siftingsmetaboliete in die afwesigheid van 'n kliniese beeld wel 'n aanduiding gee van moontlike peroksisomale defekte: (a) dikarboksielsuururie met 'n hoë sebasiensuur/adipiensuur verhouding, (b) tirosielurie, (c) akkumulasie van 2-OH sebasiensuur.

Die teenwoordigheid van hierdie metaboliete kan ook dui op ander metabolisme afwykings soos glikogeenstoringsdefekte en mitochondriale β -oksidasiedefekte, maar word slegs aangewend as 'n siftingsproses sodat die nodige opvolganalises gedoen kan word.

LITERATUURLYS

BAERENDS, R.J.S., FABER, K.N., KIEL, J.A.K.W., VAN DER KLEI, I.J., HARDER, W., VEENHUIS, M. 2000. Sorting and function of peroxisomal membrane proteins. FEMS Microbiology Reviews. 24: 291 – 301.

BAXTER, J.H. 1968. Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with Refsum's disease. Journal of Lipid Research. 9: 636 – 641.

BEUKEMA, B. 2004. Stofwisselingsziekten. Een inleiding in de aangeboren stoornissen van de stofwisseling. [Web:] <http://www.homepages.hetnet.nl/~b1beukema/index.html> [Datum van toegang: 12 Desember 2004].

BROWN, L.B. & BAKER, A. 2003. Peroxisome biogenesis and the role of protein import. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 7(4):388 – 400.

CHALMERS, R.A. & LAWSON, A.M. 1982. Organic acids in Man. Analytical Chemistry, Biochemistry and Diagnosis of the Organic Acidurias. New York: Chapman and Hall Ltd. P 350 – 382.

CHEDRAWI, A. & CLARK, G. 2002. Peroxisomal disorders. EMedicine. [Web:] <http://www.emedicine.com/> [Datum van toegang: 11 Oktober 2004].

CLAYTON, P.T. 2001. Clinical consequences of defects in peroxisomal β -oxidation. Biochemical Society Transactions. 29(2): 298 – 305.

DIMD (Dorland's illustrated medical dictionary.) 2003. Philadelphia: Saunders.: Elsevier. 637 p.

DUBOIS-DALCQ, M., FEIGENBAUM, V., AUBOURG, P. 1999. The neurobiology of X-linked adrenoleukodystrophy, a demyelinating peroxisomal disorder. Perspectives on Disease. 22(1): 4 – 12.

ERASMUS, C., MIENIE, L.J., REINECKE, C.J., WADMAN, S.K. 1985. Organic aciduria in late-onset biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*. 8(2): 105 – 106.

FUJIKI, Y. 2000. Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *Federation of European Biochemical Societies*. 476:42 – 46

GARTNER, J. 2003. Is there a Phenotype/Genotype Correlation in Peroxisome Biogenesis Disorders (PBDs)? *Advanced Experimental Medical Biology*. 544:59 – 65.

GOULD, S.J. 2001. The peroxisome website. [Web:] <http://www.peroxisome.org/> [Datum van toegang: 8 Maart 2004].

GOULD, S.J. & VALLE, D. 2000. Peroxisome biogenesis disorders genetics and cell biology. *Trends in Genetics*. 16(8):340 – 345.

GRAYER, J. 2005. Recognition of Zellweger syndrome in infancy. *Advances in neonatal care*. 5(1):5 – 13.

HETTEMA, E.H. & TABAK, H.F. 2000. Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1486: 18 – 27.

HURBER, L. 2001. Method validation. Literature references on Validation of analytical methods. [Web:] http://www.labcompliance.com/methods.meth_val.htm

KORMAN, S.H., MANDEL, H., GUTMAN, A. 2000. Characteristic urinary organic acid profile in peroxisomal biogenesis disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 23: 425 – 428.

MARDENS, Y., KUMPS, A., PLACHON, C., WURTH, C. 1992. Comparison of two extraction procedures for urinary organic acids prior to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 577:341 – 346.

MCGUINNESS, M.C., WEI, H., SMITH, K.D. 2000. Therapeutic developments in peroxisome biogenesis disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 9(9): 1985 – 1992.

MCKUSICK, V.A., 2004. Online Mendelian Inheritance in Man. Johns Hopkins University, [Web:] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez.fcgi?db=OMIM> [Date of access: 18 October 2004].

MOSER, H.W. 1999. Genotype-Phenotype Correlations in Disorders of Peroxisome Biogenesis. *Molecular Genetics and Metabolism*. 68:316 – 327.

MUKHERJI, M., SCHOFIELD, C.J., WIERZBICKI, A.S., JANSEN, G.A., WANDERS, R.J.A., LLOYD, M.D. 2003. The chemical biology of branched-chain lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*. 42: 359 – 376.

NIWA, T. 1995. Mass spectrometry in disorders of organic acid metabolism. *Clinica Chimica Acta. Clinical Mass Spectrometry*. 241 – 242: 292 – 384.

OSMUNDSEN, H., BREMER, J., PEDERSEN, J.I. 1991. Metabolic aspects of peroxisomal β -oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1085: 141 – 158.

ROCCHICCIOLI, F., AUBOURG, P., BOUGNERES, P.F. 1986. Medium- and Long-Chain Dicarboxylic Aciduria in Patients with Zellweger Syndrome and Neonatal Adrenoleukodystrophy. *International Pediatric Research Foundation*. 20(1): 62 – 66.

PAI, G.S., KHAN, M., BARBOSA, E., KEY, L.L., CRAVER, J.R., CURE, J.K., BETROS, R., SINGH, I. 2000. Lovastatin Therapy for X-linked Adrenoleukodystrophy: Clinical and Biochemical Observations on 12 Patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 69: 312 – 322.

SOKAL, E.M., SMETS, F., BOURGOIS, A., VAN MALDERGEM, L., BUTS, J.P., REDING, R., BERNARD OTTE, J., EVRARD, V., LATINNE, D., VINCENT, M.F., MOSER, A., SORIANO H.E. 2003. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety and metabolic follow-up. *Transplantation*. 76(4): 735 – 738.

SUH, J.W., LEE, S.H., CHUNG, B.C. 1997. GC-MS determination of organic acids with solvent extraction after cation-exchange chromatography. *Clinical Chemistry*. 43(12): 2256 – 2261.

SUZUKI, Y., SHIMOZAWA, N., IMAMURA, A., FUKUDA, Y., ICHIHASHI, H., ORII KONDO, N. 1996. Trial of docosahexaenoic acid supplementation on a Japanese patient with a peroxisome biogenesis defect. *Acta Paediatrica Japan*. 38(5): 520 – 530.

VAN VELDHoven, P.P., CASTEELS, M., MANNAERTS, G.P., BAES, M. 2001. Further insights into peroxisomal lipid breakdown via α - and β -oxidation. *Biochemical Society Transactions*. 29(2): 292 – 298.

VERHOEVEN, N.M. & JAKOBS, C. 2001. Human metabolism of phytanic acid and pristanic acid. *Progress in Lipid Research*. 40:453 – 466.

VREKEN, P., VAN LINT, A.E.M., BOOTSMA, A.H., OVERMARS, H., WANDERS, R.J.A., VAN GENNIP, A.H. 1998. Rapid stable isotope dilution analysis of very-long-chain fatty acids, pristanic acid and phytanic acid using gas chromatography-electron impact mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 713: 281 – 287.

WANDERS, R.J.A., VAN ROERMUND, C.W.T., SCUTGENS, R.B.H., BARTH, P.G., HEYMANS, H.S.A., VAN DEN BOSCH, H., TAGER, J.M. 1990. The inborn errors of Peroxisomal β -oxidation: A Review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 13: 4 – 36.

WANDERS, R.J.A. & TAGER, J.M. 1998. Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 19: 71 – 154.

WANDERS, R.J.A., SCHUTGENS, R.B.H., BARTH, P.G. 1996. Peroxisomal disorders. (*In* Blau, N., Duran, M., Blaskovics, M.E. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases* p. 358 - 376).

WANDERS, R.J.A., VAN GRUNSVEN, E.G., JANSEN, G.A. 2000. Lipid metabolism in peroxisomes: enzymology, functions and dysfunctions of the fatty acid α - and β -oxidation systems in humans. *Biochemical Society Transactions*. 28: 141 – 149.

WANDERS, R.J.A., VREKEN, P., FREDINANDUSSE, S., JANSEN, G.A., WATERHAM, H.R., VAN ROERMUND, C.W.T., VAN GRUNSVEN, E.G. 2001. Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal

metabolite transporters and peroxisomal diseases. Biochemical Society Transactions. 29(2): 250 – 267.

WANDERS, R.J.A., JANSEN, G.A., LLOYD, M.D. 2003. Phytanic acid alpha-oxidation, new insights into an old problem: a review. Biochimica et Biophysica Acta. 1631:119 – 135.

WIERZBICKI, A.S., LLOYD, W.D., SCHOFIELD, C.J., FEHER, M.D., GIBBERD, F.B. 2002. Refsum's disease: a peroxisomal disorder affecting phytanic acid α -oxidation. Journal of Neurochemistry. 80: 727 – 735.

YAMAGUCHI, S., IGA, M., KIMURA, M., SUZUKI, Y., SHIMOZAWA, N., FUKAO, N., TAZAWA, Y., ORII, T. 2001. Urinary organic acids in peroxisomal disorders: a simple screening method. Journal of Chromatography B. 758: 81 – 86.