

**'N ONDERSOEK NA DIE MOONTLIKHEID OM 'N
TRISIKLIESE HOKVERBINDING AS 'N DRAERMOLEKULE
VIR DIE TRANSPORT VAN KARNITIEN OOR
SELMEMBRANE TE GEBRUIK**

Jacques Lourens van Onselen

B.Sc. Honns.

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in Biochemie in die Fakulteit Natuurwetenskap aan die
Potchefstroom Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys

Studieleier: Prof. L.J. Mienie Ph.D

Potchefstroom

2001

INHOUDSOPGAWE

Bladsy

ABSTRACT.....	i
OPSOMMING.....	iii
HOOFSTUK 1: INLEIDING.....	1
1.1 INLEIDING.....	1
1.2 DIE PROBLEEM.....	1
1.3 DIE MOONTLIKE OPLOSSING.....	2
1.4 DIE UITEENSETTING.....	3
HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG.....	4
2.1 INLEIDING.....	4
2.2 ADAMANTAAN.....	4
2.2.1 Karakteristieke eienskappe.....	6
2.2.2 Toepassings.....	7
2.3 KARNITIEN.....	9
2.3.1 Inleiding.....	9
2.3.2 Metaboliese Funksie.....	10
2.3.2.1 Karnitien se rol in transport tydens vetsuuroksidasie..	10
2.3.2.2 Karnitien se rol by vrye KoA.....	13
2.3.2.3 Karnitien in detoksifiseringsreaksies.....	13
2.3.2.4 Karnitien bevorder energieproduksie.....	13
2.3.2.5 Karnitien bevorder lipied verbruik.....	14
2.3.2.6 Karnitien bevorder ATP-translokasie.....	14
2.3.2.7 Karnitien fasiliteer vertakte ketting α -ketosuuroksidasie	14

2.3.3	Karnitien ingestie en ekskresie.....	14
2.3.4	Biosintese van karnitien.....	15
2.3.5	Karnitien transport en verdeling.....	17
2.3.6	Karnitientransportproteïen (KTP).....	18
2.3.7	Karnitiendefekte.....	19
2.3.7.1	Primêre Karnitiendefek.....	20
2.3.7.2	Sekondêre Karnitiendefek.....	22
2.3.8	Behandeling van Defekte.....	22
2.3.9	Nuwe effekte van karnitientherapie.....	23
HOOFSTUK 3: METODES.....		24
3.1	INLEIDING.....	24
3.2	CHEMIESE SINTESE: ADAMANTAANKARNITIEN- KONJUGATE.....	25
3.2.1	1-Adamantaankarboksielsuur- en 1-adamantaanasynsuur- karnitien.....	25
3.2.2	2-Amantadienkarnitien.....	26
3.2.3	Kondisies van elektrospoei tandem massaspektrometrie (ES-MS-MS) vir adamantaankarnitien-konjugaat analyses....	27
3.3	BELADING VAN PROEFDIERE MET KARNITIENKONJUGAAT	29
3.3.1	Eksperimentele opstelling.....	30
3.3.2	Karnitienanalises.....	30
3.3.2.1	Bloed karnitienanalise.....	30
3.3.2.2	Urien karnitienanalise.....	31
3.3.3	Kondisies van elektrospoei tandem massaspektrometrie (ES-MS-MS) vir karnitienanalises.....	31
3.4	TRANSPORTSTUDIE VAN ADAMANTAANKARNITIEN- KONJUGATE IN FIBROBLASTSELKULTURE.....	32
3.4.1	Kweking van fibroblastselkulture.....	33
3.4.2	Voorbereiding van fibroblastsele vir analise.....	33

3.4.3	β -oksidasie analise.....	34
3.4.4	Vrye L-karnitienanalise in fibroblastselkulture.....	36
3.5	BEPALING VAN ESTERASE AKTIWITEIT MET ADAMANTAAN-KARNITIEN KONJUGAAT AS SUBSTRAAT.....	36
3.5.1	Eksperimentele prosedure.....	37
	HOOFSTUK 4: RESULTATE.....	39
4.1	INLEIDING.....	39
4.2	CHEMIESE SINTESE VAN DIE ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE.....	40
4.2.1	1-Adamantaankarboksiel-, 1-Adamantaanasynsuur- en 2-Amantadienkarnitien.....	40
4.3	BELADING IN ROTTE.....	42
4.3.1	Karnitien en asetielkarnitienkonsentrasies na belading.....	42
4.3.2	Urinêre karnitienanalises.....	47
4.3.2.1	Karnitienkonsentrasie relatief tot die kreatinien waardes.....	47
4.4	BESPREKING.....	52
4.5	ONDERSOEK NA DIE VERMOË VAN VARKLEWER-ESTERASE OM 1-ADAMANTAANKARBOKSIELSUUR- EN 1-ADAMANTAAN-ASYNSUURKARNITIEN TE HIDROLISEER.....	52
4.5.1	Ondersoek na die moontlikheid dat varklewer-esterase die adamantaankarnitien-konjugate kan hidroliseer.....	53
4.5.2.	Bespreking.....	54
4.6.	TRANSPORTSTUDIE VAN ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE IN FIBROBLASTSELKULTURE.....	55
4.6.1.	Inleiding.....	55
4.6.2	β -oksidasie aktiwiteit voor en na behandeling van selle met adamantaankarnitien-konjugate.....	55

4.6.3	Vrye L-karnitien teenwoordig voor en na behandeling van selle met adamantaankarnitien-konjugate.....	56
4.6.4	Bespreking.....	56
HOOFSTUK 5: BESPREKING EN GEVOLGTREKKING.....		57
5.1	INLEIDING.....	57
5.2	CHEMIESE SINTESE: ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE.....	57
5.3	ABSORPSIE EN VRYSTELLING VAN ADAMANTAAN-KARNITIEN-KONJUGATE.....	58
5.4	TRANSPORT EN EFFEK VAN KARNITIEN-ADAMANTAAN-KONJUGATE IN EN OP FIBROBLASTSELKULTURE.....	59
5.5	SAMEVATTING.....	60
BYLAAG 1.....		61
HOOFSTUK 6: LITERATUUR VERWYSINGS.....		66
BEDANKINGS.....		79

LYS VAN FIGURE EN TABELLE

Bladsy

Tabel 2.2.1: Opsommende karakteristieke van die adamantaan-derivate...	5
Figuur 2.3.a: Molekulêre struktuur van karnitien.....	9
Figuur 2.3.b: Voorstelling van metabolisme waarby karnitien betrokke is..	11
Figuur 2.3.c: Karnitienbiosintese.....	15
Tabel 2.3.1: Die kinetiese konstantes van karnitientransportproteïen in verskeie weefseltipes.....	18
Figuur 3.2.1 Die gesintetiseerde adamantaankarnitien-konjugate.....	26
Figuur 3.2.2 Gesintetiseerde 2-amantadienkarnitien-konjugaat.....	27
Tabel 3.2.3: Kondisies vir MS-analise.....	28
Tabel 3.3.3: Kondisies vir MS-analise.....	31
Tabel 3.3.1: Die samestelling van die inkubasiereaksies.....	34
Tabel 3.5.1: Esterase ensiem analise opstelling.....	37
Figuur 4.2.1. ES-Massaspektrum van gesuiwerde 1-Adamantaanasynsuur- karnitien (m/z 338).....	40
Figuur 4.2.2. ES-Massaspektrum van gesuiwerde 1-Adamantaankarboksiel- karntien (m/z 324).....	41
Figuur 4.2.3. ES-Massaspektrum van gesuiwerde 2-Amantadienkarnitien (m/z 295).....	41
Figuur 4.3.1.a: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 1.....	43
Figuur 4.3.1.b: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 2.....	43
Figuur 4.3.1.c: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 3.....	44
Figuur 4.3.1.d: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 4.....	44
Figuur 4.3.1.e: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 5.....	45
Figuur 4.3.1.f: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 6.....	45
Figuur 4.3.1.g: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 7.....	46
Figuur 4.3.1.h: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 8.....	46

Tabel 4.3.2.1.a: Kreatinienwaardes soos verkry vir uriene van elke rot.....	47
Figuur 4.3.2.1.a: Urinêre karnitienanalise van rot 1.....	48
Figuur 4.3.2.1.b: Urinêre karnitienanalise van rot 2.....	48
Figuur 4.3.2.1.c: Urinêre karnitienanalise van rot 3.....	49
Figuur 4.3.2.1.d: Urinêre karnitienanalise van rot 4.....	49
Figuur 4.3.2.1.e: Urinêre karnitienanalise van rot 5.....	50
Figuur 4.3.2.1.f: Urinêre karnitienanalise van rot 6.....	50
Figuur 4.3.2.1.g: Urinêre karnitienanalise van rot 7.....	51
Figuur 4.3.2.1.h: Urinêre karnitienanalise van rot 8.....	51
Figuur 4.5.1. Ensiemaktiwiteit soos bepaal met p-nitrofenielasetaat as substraat.....	53
Tabel 4.5.1: Oorblywende konjugaat na ensiem hidrolise.....	54
Figuur 4.6.2.a: β-oksidasie aktiwiteit soos bepaal m.b.v. palmtiensuur- oksidasie	55
Figuur 4.6.3.a: Vrye karnitienkonsentrasie in fibroblaste.....	56

ABSTRACT

The importance of L-carnitine in the metabolism has long been a scientific fact. For certain individuals with a carnitine transport defect, the supplementation with carnitine is of life importance. The treatment of such patients includes the oral intake of a high dose of L-carnitine. This approach assures that the residual transport activity of the defective carnitine transport protein (CTP), is maximally used to prevent intracellular carnitine levels from becoming depleted. This method of treatment however poses a few side effects. The aim of this study is to evaluate a possible alternative transport mechanism for carnitine, through which the intracellular L-carnitine levels could possibly be increase to such extend that normal activity can be rectified.

Literature has shown that the uptake of a drug can be increased through the attachment of a macro molecular compound, which facilitates the transport. This lead to the chemical synthesis of adamantane carnitine conjugates through the joining of L-carnitine with tricyclic cage compounds namely 1-adamantane carboxylic acid, 1-adamantane acetic acid and 2-adamantadine.

For the aim of this study various approaches will be followed. The first includes administering oral dosages of adamantane carnitine conjugates to experimental animals. For this purpose the *Sprague Dowley* rats was used. The presence of the conjugate as well as the free carnitine levels is determined in the blood and urine of the rats, which could give an indication of absorption, the degree of hydrolyses in the blood and the excretion through the urine. The second approach includes enzyme stability tests for each conjugate, through the use of an esterase enzyme. Finally the transport of the adamantane carnitine conjugate across cell membranes is determined. For this purpose fibroblast cells obtained from a patient suffering from a known inborn carnitine transport protein defect is used. The effectiveness of the adamantane carnitine conjugates is determine through monitoring the fatty acid oxidation. Increased carnitine levels will

enhance β -oxidation activity, which could serve as an indicator of successful transport of carnitine via the adamantane carnitine conjugate.

After the successful synthesis of the adamantane carnitine conjugates the results show a minimum to no increase in the free carnitine or acetyl carnitine levels in the blood and urine of the experimental animals after administration of the adamantane carnitine conjugates. In most cases the concentrations remained constant or even decreased. The esterase enzyme stability analysis also showed few to no hydrolyses of the adamantane carnitine conjugates. The transport study in fibroblast cell cultures showed a decrease in β -oxidation activity. This indicates a decrease in free carnitine levels, which highlights a possible transport inhibition. In conclusion the results is indicative of no potential usage of the adamantane carnitine conjugates as treatment for patients with metabolic defects. On the contrary the conjugate has potential to be used as a model to study carnitine transport defects.

OPSOMMING

Die belangrikheid van L-karnitien in die metabolisme is vir baie lank al 'n wetenskaplike feit. Vir verskeie individue wat lei aan 'n defek in die karnitien transport sisteem is karnitien aanvulling 'n lewensnoodsaaklikheid. Die behandeling van sulke pasiënte behels die orale inname van 'n hoë dosis L-karnitien. Die benaderingswyse het ten doel om die residuele karnitientransportaktiwiteit van die defektiewe karnitientransportproteïen (KTP), maksimaal te aktiveer sodat die intrasellulêre karnitien vlakke nie lewensgevaarlik daal of uitgeput raak nie. Die benaderingswyse het egter 'n paar nuwe-effekte. Die doelstelling van die studie is om 'n moontlike alternatiewe weg vir die transport van karnitien te evalueer, wat moontlik die intrasellulêre vlakke van vrye L-karnitien sodanig kan verhoog dat normale aktiwiteit herstel kan word.

Vanuit die literatuur is daar gevind dat die transport van 'n geneesmiddel verhoog word deur dit aan 'n makromolekulêre verbinding te verbind, wat die transport van die geneesmiddel fasiliteer. Gevolglik is adamantaan-karnitien konjugate chemies gesintetiseer deur die koppeling van L-karnitien aan trisikliese hokverbindinge nl. 1-adamantaankarboksielsuur, 1-adamantaanasynsuur en 2-amantadien.

Vir die doel van die studie is verskeie benaderingswyses gevolg. Die eerste behels die orale toediening van die adamantaan-karnitien-konjugate vir proefdiere. Vir die doel is beladings van *Sprague Dowley*-rotte gebruik. Die teenwoordigheid van die konjugate asook vrye karnitien is in die bloed en urine van die rotte gevolg wat 'n aanduiding kan wees van absorpsie, die mate van hidrolise in die bloed en uitskeiding deur die niere. Tweedens is die ensiemstabiliteit van elke verbinding bepaal aan die hand van 'n esterase ensiem. Laastens is die transport van die adamantaan-karnitien-konjugate oor selmembrane bepaal. Vir die doel is fibroblasteselle verkry van 'n pasiënt met 'n bekende aangebore defek van die karnitien transportproteïen. Die effek van die adamantaan-karnitien-konjugaat transport is bepaal deur die oksidasie van vetsure te

monitor. Verhoogde karnitienvlakke sal in die geval β -oksidase bevoordeel en kan dus 'n aanduiding wees van suksesvolle transport van karnitien deur middel van die adamantaankarnitien konjugate.

Na die suksesvolle sintese van die adamantaankarnitien-konjugate toon die resultate dat min tot geen van die adamantaankarnitien-konjugate gelei het tot verhoogde vrye karnitien of asetiel-karnitienvlakke in die bloed of uriene nie. In die meeste gevalle het die konsentrasies konstant gebly of 'n geringe afname getoon. Die esterase ensiemstabiliteits analise toon ook dat min tot geen hidrolise van die adamantaankarnitien-konjugate plaas gevind het nie. Die transportstudie in fibroblastselkulture het verlaagte oksidasie aktiwiteit getoon. Dit dui op 'n verlaaging in die vrye karnitienvlakke en gevolglik 'n moontlike transport inhibisie. Die resultate toon dus dat die adamantaankarnitien-konjugate oor geen potensiaal beskik om as behandelingsmetode vir pasiënte met metaboliese defekte gebruik te word nie. In teen deel het dit waarskynlik potensiaal om die effek van karnitientransport defekte te ondersoek en kan moontlik in die toekoms as 'n model gebruik word.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

1.1 INLEIDING

In die menslike liggaam heers 'n toestand van metaboliese ewewig. 'n Defek in die metaboliese weg kan lei tot 'n versteuring van die ewewig. Verskeie pasiënte se lewe word geaffekteer deur so 'n defek nl. karnitien transport defek. Die doelstelling van die projek is om die moontlikheid te ondersoek vir 'n alternatiewe weg waarlangs karnitien getransporteer kan word, om ewewig in so 'n metabolies versteurde lewe te herstel. Indien daar geslaag kan word om so 'n alternatief te ontwikkel, kan lewenskwaliteit herstel word en gevolglik lei tot die normalisering en balansering van so 'n metabolies versteurde lewe.

1.2 DIE PROBLEEM

Sekere individue beleef 'n metaboliese afwyking waartydens 'n metaboliet, L-karnitien, nie effeketief beskikbaar is om normale metaboliese aktiwiteit te verseker nie. Die oorsake en gevolge daarvan word later beskryf. Dis egter kommerwekkend aangesien so 'n individu die gevaar loop dat metaboliese harmonie sodanig versteur word dat die dood kan intree.

Die belangrikheid van karnitien as kofaktor in die metabolisme is 'n wetenskaplike feit. Dit het gelei tot 'n ontploffing in die navorsing aangaande karnitien biosintese en transport (Borum, 1986). Die skielike belangstelling is geïnisieer deur twee baie belangrike onthullings:

- Broquist en kollegas ontdek dat karnitien essensieël vervaardig word vanaf die aminosuur lisien wat ook terselfdetyd in beperkte hoeveelhede in die dieet van die meeste derde wêreldse bevolkingsgroepe voorkom (Broquist *et al.*, 1971).

-
- Engel & Angelini (1973) dokumenteer gevallestudies van karnitiengebreek sindroom met oënskynlike genetiese oorsprong.

Vandag is die probleem nog dieselfde, maar baie meer kennis rondom die defek en ander verwante kliniese gevalle is al versamel. Die rol wat karnitien speel in die verwante defekte kan afgebaken word na twee belangrike hoof funksies:

- Karnitien tree op as 'n transportmolekule in die intrasellulêre omgewing onder andere die mitochondria (Voet *et al.*, 1995:668).
- Karnitien fasiliteer detoksifisering in die liggaam via konjugering (Chalmers *et al.*, 1983).

Die direkte gevolge van enige vorm van immobilisering van karnitien in die metabolisme spreek vanself, tensy iets daar rondom gedoen kan word.

1.3 DIE MOONTLIKE OPLOSSING

Die behandeling van pasiënte met karnitiengebreek sindroom behels die inname van 'n hoë dosis L-karnitien. Dit het ten doel om die residuele karnitientransportaktiwiteit, maksimaal te aktiveer sodat die intrasellulêre karnitien vlakke nie lewensgevaarlik daal of uitgeput raak nie. Die vraag ontstaan egter of alternatiewe behandeling bestaan wat sal kan verseker dat intrasellulêre vlakke van vrye L-karnitien sodanig verhoog kan word, sodat normale aktiwiteit herstel kan word nie? Die antwoord kan moontlik gevind word indien daar gestreef word om 'n alternatiewe transportsisteem te ontwikkel.

Volgens Donaruma & Vogl, (1978) en Ringsdorf, (1975) kan die transport van 'n geneesmiddel verhoog word deur dit aan 'n makromolekulêre verbinding te verbind wat die transport van die geneesmiddel fasiliteer. Baie aandag is al daaraan gegee om verbindings te sintetiseer wat farmakologies aktief in die liggaam kan wees nadat dit ensiematies verander is vanaf 'n makromolekuul om die aktiewe bestanddeel vry te laat. Gesien die stelling, is besluit om die volgende doelstelling as hipotese op te neem:

“ ‘n Ondersoek na die moontlikheid om ‘n trisikliese hokverbinding as ‘n draermolekuul vir die transport van karnitien oor selmembrane te gebruik.”

Die koppeling van L-karnitien aan ‘n draermolekuul wat as transportfasiliteerder kan optree, sal vervolgens geëvalueer word as moontlike oplossing vir die probleemstelling.

1.4 DIE UITEENSETTING

In die volgende hoofstukke gaan gestreef word om die hipotese te evalueer sodat ‘n finale samevatting gemaak kan word rondom die moontlike toepassing van die konjugaat as behandeling in die praktyk. In hoofstuk 2 word ‘n literatuur oorsig gegee aangaande adamantaan, karnitien en die onderskeie konjugaatverbindinge met spesiale aandag aan die defek onder bespreking. Hoofstuk 3 het ten doel om te verduidelik hoe daar te werk gegaan is in die verskeie eksperimentele benaderings. Die metodes en materiaal gebruik tydens analises is ingesluit. In hoofstuk 4 word die resultate van elke analise weergegee. Hoofstuk 5 dien as bespreking waarin die hipotese geëvalueer word en ‘n finale samevatting gemaak word.

HOOFSTUK 2

LITERATUUR OORSIG

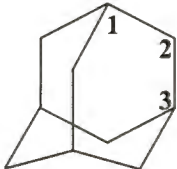
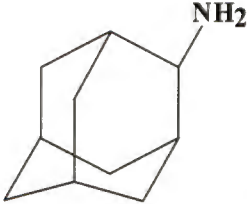
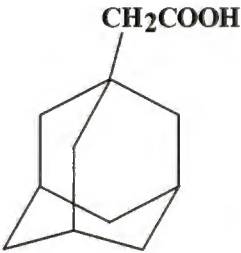
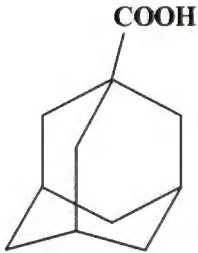
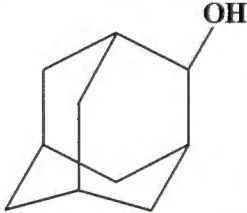
2.1 INLEIDING

Die doelstelling van hierdie studie is om die moontlikhede te ondersoek om 'n trisikliese hokverbinding te gebruik as draermolekule vir die transport van L-karnitiese selmembrane. 'n Oorsig word gegee vanuit beskikbare literatuur ter verduideliking van die probleemstelling. Die hoofkomponente nl. die adamantaan-derivate en L-karnitiese word bespreek, asook die belangrike rol wat die komponente tans speel in navorsing. Die karaktereienskappe en toepassings van die twee verbindings is baie belangrik omrede transport, wat hier ter sprake is, afhanklik is van die eienskappe van die molekules. Spesiale aandag word ook gegee aan die betrokke defekte in die metabolisme wat belangrik is vir die toepassing van bogenoemde verbindings.

2.2 ADAMANTAAN

Adamantaan [(1) Tabel. 2.2.1.] is 'n simmetriese koolwaterstof hokstruktuur wat in die natuur voorkom. Dit is ontdek deur Landa & medewerkers in 1933 waar dit uit petroleum geïsoleer is in Tseggoslowakye (Landa, 1933:27). Die komplekse hokstruktuur is die eerste keer in 1941 deur Prelog en Seiwert gesintetiseer (Prelog *et al.*, 1941). Sedertdien word verskeie derivate van adamantaan vervaardig en vind dit wye toepassing in mediese navorsing en veral as draermolekule vir die bevordering van transport en antivirale middels.

Tabel 2.2.1: Opsommende karakteristieke van die adamantaan-derivate

Derivaat	Formule	Mol. Gewig (<i>m/z</i>)	Smeltpunt	Struktuur
[1]. Adamantaan	$C_{10}H_{16}$	136	268 °C	
[2]. 2-Adamantaan- Amien (Amantadien)	$C_{10}H_{18}N$	151	180-192 °C	
[3]. 1-Adamantaan- Asynsuur	$C_{12}H_{18}O_2$	194	142-143 °C	
[4]. 1-Adamantaan- Karboksielsuur	$C_{11}H_{16}O_2$	180	254-255 °C	
[5]. 2-Adamantanol	$C_{10}H_{16}O$	152	260-265 °C	

(Uit: Buckingham, 1982 : 70-72).

2.2.1 Karakteristieke eienskappe

Die verskeie adamantaan-derivate deel almal 'n universele ringstruktuur wat bestaan uit die volgende imperiese formule: $C_{10}H_{16}$. Die C_{10} -koolwatersof ringstruktuur is opgebou uit drie sikloheksaanringe wat baie min wringvervormingskrag ondervind en gevolglik is die struktuur uiters stabiel (Raymond & von Schleyer, 1964). In, tabel 2.2.1., word die strukture van 'n aantal adamantaan derivate wat beskikbaar is weergegee.

Die adamantaan-verbindings besit 'n groot aantal koolwaterstofmolekules wat die ringstrukture vorm, gevolglik het die verbindings 'n apolêre karakter. Dit veroorsaak dat die verbindings 'n lipofiliese karakter openbaar. Die verbindings is dus oor die algemeen relatief swak wateroplosbaar en los goed op in organiese oplosmiddels soos bv. metanol, chloroform, benseen ens (Florey, 1983). Adamantaan se wateroplosbaar kan egter verbeter word deur funksionele polêre groepe daaraan te koppel (Aoki & Sitar, 1988).

Die sintese van adamantaan en al die derivate is vandag algemene kennis en kan maklik deur herrangskikkingsreaksie vervaardig word (Raymond & von Schleyer, 1964). In die adamantaanringstruktuur kom daar sekondêre (2) en tersiêre koolstowwe (1 en 3) voor (Sien figuur in tabel 2.2.1.). Volgens Morrison *et al.*, (1987) reageer sekondêre koolstowwe makliker met ander molekules as die tersiêre koolstowwe.

Vanuit die literatuur is gevind dat amantadien meer dikwels gebruik is in behandelings en projekte waar die mens betrokke was. Hieruit is die volgende feite rondom amantadien waargeneem:

- Sedert die eerste kliniese studies van Amantadien in 1960, is dit bewys dat die middel nie-toksies is nie, maar wel liggaamsvreemd. Köppel en Tenczer (1985) het bewys dat alhoewel die grootste hoeveelheid amantadien ongemetaboliseerd uitgeskei word in uriene, 5 tot 15 % as die geasetileerde vorm uitgeskei word. Verdere moontlike metabolisme weë sluit in N-metilering en Schiff base N-formaat vorming (Köppel & Tenczer, 1985). Ekskresie vind hoofsaaklik via die niere in uriene plaas met 'n gedeeltelike uitskeiding in die fesus (Aoki & Sitar, 1988).

-
- 'n Aantal hoogs relefante toepassings is ontwikkel oor die jare vir die adamantaan-derivate (Sien afdeling 2.2.2.). Ongelukkig is daar ook 'n paar newe-effekte wat gepaart gaan met die gebruik van die verbindings. Dit sluit o.a. die volgende in: slaaploosheid, duiseligheid, angstigheid, verwarring, depressie, dispepsia en hardlywigheid (Aoki & Sitar, 1988). Hipersensitiwiteit is ervaar deur sommige persone wat die verbinding oraal ingeneem het (Plioplys & Plioplys, 1997).
 - Dosis vir pasiënte begin met 100 mg/dag met 'n geleidelike toename tot 'n maksimum van 400-500mg/dag. Amantadien het 'n plasma halfleeftyd van ± 15 ure en absorpsie halfleeftyd van 0.6 ± 0.5 ure (Aoki & Sitar, 1988).
 - Die transport van klein neutrale molekules soos adamantaan vind plaas via twee moontlike meganismes. Die beweging vanaf 'n waterige fase na 'n ander waterige fase oor 'n lipied bi-laag kan eerstens plaasvind deur 'n kinetiese eerste-orde proses aangedryf deur 'n konsentrasie gradiënt. 'n Tweede moontlikheid behels die transport oor die lipied bi-laag deur 'n kinetiese anorganiese kation-uitruil transportmeganisme (Bergstrom *et al.*, 1991). Wat ookal die meganisme van transport is, dit wil voorkom of adamantaan-derivate maklik oor die meeste liggaamsmembrane kan beweeg

2.2.2 Toepassings

Uit die literatuur het gebleik dat adamantaan en derivate van adamantaan gebruik is in ondersoek na die behandeling van 'n verskeidenheid siektetoestande:

1. Amantadien en L-karnitien is afsonderlike toegedien vir 30 pasiënte met KMS (kroniese moegheids-sindroom) oor 'n tydperk van twee maande. Resultate toon 'n drastiese verbetering in pasiënte wat L-karnitien ontvang het met geen verbetering in die pasiënte wat amantadien ontvang het nie (Plioplys & Plioplys, 1997).

-
2. Amantadien is baie effektief gebruik in die behandeling van moegheid in pasiënte met kroniese neurologiese kondisies, soos bv. meervoudige sklerose (Chiba *et al.*, 1992). Amantadien het ook plasmavlakke van β -endorfin- β -lipotropien, 'n endogene senuweestelsel opioïed, in pasiënte met meervoudige sklerose verhoog (Rosenberg & Appenzeller, 1988).
 3. Amantadien word algemeen voorgeskryf as 'n anti-parkinsonmiddel. Die werking as anti-parkinsonmiddel behels die vrystelling van dopamien vanuit perifere neuronale stoorplekke (Farnebo *et al.*, 1971).
 4. Amantadien vertoon anti-virale eienskappe teen 'n wye reeks influenza-A virusse en kan moontlik profilakties aangewend word om infeksie te voorkom. (Aoki *et al.*, 1985 en Kolocouris *et al.*, 1996).
 5. Alkohol-derivate van adamantaan vertoon anti-bakteriële eienskappe. Minimum inhibisie konsentrasies vir die derivate teen sekere bakteriële spesies is bepaal. Verder is ook bewys dat daar 'n kritiese kettinglengte is vir die alkohol waar optimale aktiwiteit verkry word ten opsigte van dodingsvermoë en membraan deurlaatbaarheid (Antoniadou-Vyza *et al.*, 1996).
 6. Adamantaankarboksielsuur is gekoppel aan piridielalkiel groepe en daar is bewys dat die verbindings inhibeerders is van die mens sitochroom P450_{17 α} . Dit lei tot 'n nie-steriodale toepassing vir die behandeling van prostaatkanker (Chan *et al.*, 1996).
 7. 1-Adamantaanasynsuur en 1-adamantaankarboksielsuur is gekoppel aan sekere biologies aktiewe peptiede, vir die fasilitering van transport. Hierdie moontlike toepassing is veral aangewend vir die ondersoek na die transport van reseptor antagonist. (Turner *et al.*, 2000; Lammek *et al.*, 1991; Kearney *et al.*, (1992:9)
 8. Dit is bekend dat AZT (Azidothymidine) swak in die breinparenchium in getranspoteer word. Verskeie 1-Adamantaan-AZT-derivate het tot 18 keer hoër absorpsie getoon (Tsuzuki *et al.*, 1994). Verder is ook getoon dat die vrystelling van

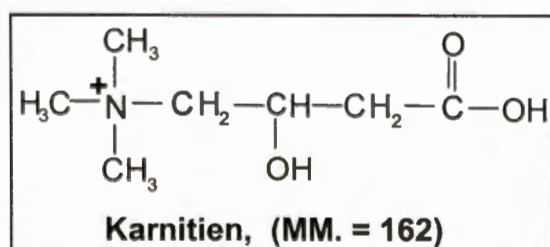
AZT vanaf die AZT-adamantaan-konjugaat ensiematies kan plaasvind. Die *in vitro* vrystelling deur plasma esterase het produk vorming (vrye AZT) binne 30 min in rotplasma getoon. Mensplasma het vertraagde vrystelling getoon met 'n minimale produkvrystelling selfs na vier ure inkubasie (Tsuzuki *et al.*, 1994). Dis ook baie duidelik aangetoon dat 'n steriese hindernis a.g.v. kettinglengte, die vrystellingstempo beïnvloed.

9. Sekere stowwe word nie opgeneem deur die bloedbreinskans en sentrale senuweestelsel (SSS) nie. 1-Adamantanol is ingespan om so 'n verbinding, leukenkephalien, se transport oor die bloedbreinskans na die SSS te fasiliteer (Tsuzuki *et al.*, 1991).

2.3 KARNITIEN

2.3.1 Inleiding

L-karnitien (3-hidroksi-4-N-trimetiëlamino-buïeraat), (Sien figuur 2.3.a) is die eerste keer in 1905 uit vleis geïsoleer (Gulewitsch & Krimberg, 1905). In 1959 demonstreer Fritz, dat L-karnitien 'n baie belangrike rol speel in lang ketting vetsuuroksidasie (Fritz, 1959). In 1972, ontwikkel Cederblad & Lindsted 'n sensitiewe metode om L-karnitien te bepaal (Cederblad & Lindsted, 1972). Sedertdien is daar baie studies rondom die biologiese rol van karnitien al gedoen. Van die belangrikste eienskappe wat na vore gekom het, word vervolgens beskryf.



Figuur 2.3.a: Molekulêre struktuur van karnitien (Borum, 1986).

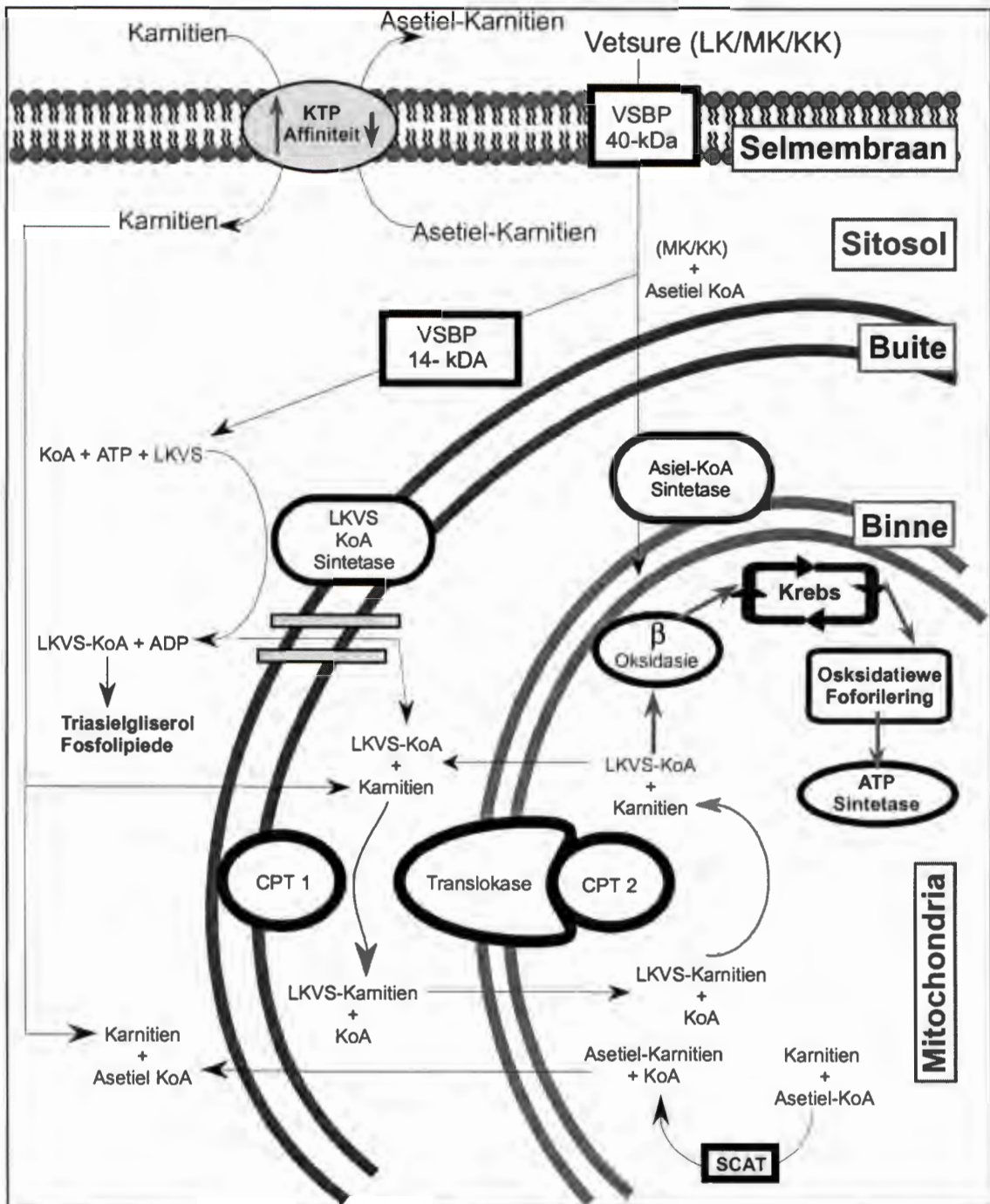
2.3.2 Metaboliese Funksie

In die mens word karnitien metabolies vervaardig of deur die dieet ingeneem. Vir nie-vegetariese individue word 75% van liggaams L-karnitien deur die dieet ingeneem en 25% verkry vanaf *de novo* biosintese (De Vivo & Tein, 1990). Karnitien is nodig vir verskeie funksies in die liggaam en kom dus algemeen in die bloed en die hele liggaam voor. Van die belangrikste metaboliese funksies sal vervolgens bespreek word.

2.3.2.1 Karnitien se rol in transport tydens vetsuuroksidasie

Baie is al geskryf oor die funksie van L-karnitien maar in besonder die funksionaliteit in die vetsuurmetabolisme van die mens (Borum, 1983; Bremer, 1983; Rebouche & Engel, 1983). Figuur 2.3.b is 'n skematiese voorstelling van die rol van karnitien in die vetsuurmetabolisme.

Na gastroïntestinale absorpsie van lipiede (triasielgliserol), vind hidrolise deur lipoproteïen- of hepatiese lipases plaas. Die produk is vrye vetsure wat getranspoteer word in die bloed na elke sel in die menslike liggaam. Vetsure dien as hoof energiebron in rustende skeletspiere en in aktiewe miokardiale spierweefsel (Angelini *et al.*, 1992). Sodra die vetsuur by die sel aankom, word die vetsuur deur 'n membraangebonde proteïen (VSBP) vanuit die plasma in die sel in getranspoteer. Stremmel, 1988, bewys dat 'n 40-kDa membraangebonde proteïen geïsoleer uit rotlewer en hartspeer, die transport van vetsure in die sel in bemiddel. Volgens Veerkamp & Paulussen (1987) bestaan daar ook sitosoliese 14 tot 15-kDa bindingsproteïene (VSBP) wat die intrasellulêre transport van vetsure fasiliteer.



Figuur 2.3.b: Voorstelling van metabolisme waarby karnitien betrokke is (Bahl & Bressler, 1987; Scholte *et al.*, 1990; Angelini *et al.*, 1992; Blau *et al.*, 1996).
Afkortings: LK – Langketting; MK – Medium ketting; KK – Kort ketting; LKVS – Lang ketting vetsuur; VSBP – Vetsuurbindingproteïen; KoA – Koënsiem A; CPT I – Karnitienpalmitoylestertransferase I; CPT II – Karnitienpalmitoylestertransferase II; SCAT – Kort ketting asiel transferase

β -oksidasie in die mitochondria en lipiedoksidasie in die peroksisome is die hooftelke vir energieproduksie uit vrye vetsure. Lang ketting vetsure (LKVS) is nie in staat om vrylik oor mitochondriale membrane te beweeg nie, terwyl medium- en kort ketting vetsure wel oor beweeg (Angelini *et al.*, 1992). Karnitien speel 'n rol by die transport proses van langketting vetsure (Bahl & Bressler, 1987). Voor transport van langketting vetsure kan plaasvind, is aktivering noodsaaklik. Die ensiem, KoA-sintetase, kataliseer die aktivering van die vetsuur deur die vetsuur na die asiel-KoA-thioester om te skakel. Die proses vind in die mikrosome plaas. Die vetsuur-KoA-thioester beweeg deur porieë in die buite membraan (Scholte *et al.*, 1990). Die binne mitochondriale membraan is egter ook ondeurlaarbaar vir asiel-KoA en hier tree karnitien as draer molekule op om lang ketting vetsure oor die membraan te transporteer (Bahl & Bressler, 1987.)

Hierdie transport proses geskied deur dat die asiel-KoA omvorm word na asielkarnitien, deur die ensiem karnitienpalmitoëltransferase I (CPT I) wat aan die binnekant van die buite mitochondriale membraan voorkom. Die ensiem vorm 'n gesamentlike transmembraan kompleks met karnitienpalmitoëltransferase II (CPT II) en asielkarnitientranslokase. Asielkarnitientranslokase in die binne mitochondriale membraan verseker dat asielkarnitien die mitochondria kan binnegaan in ruil vir asielkarnitien of karnitien. Hierdie is nie altyd 'n een tot een reaksie nie (Murthy & Pande, 1984). Dis alom bekend dat 'n enkele geen kodeer vir CPT I en CPT II maar dat die twee proteïene elk individuele karakter het met eie eienskappe (Finocchiaro *et al.*, 1992).

Medium ketting vetsure word moontlik deur lewer peroksisomale medium ketting asiel-KoA-sintetase omvorm na die karnitien ester en gevolglik getransporteer. Kort ketting vetsure soos propionaat in die lewer gaan die mitochondria binne sonder om van die translokase meganisme gebruik te maak (Bahl & Bressler, 1987).

Sodra die lang ketting vetsuur gelewer is aan die mitochondriale matriks kan β -oksidasie begin. Let wel dat kort en lang ketting vetsure ook die matriks bereik en gevolglik ook gemetaboliseer word deur β -oksidasie. Die finale produk van β -oksidasie nl. asiel-KoA kan nou deur die Krebs siklus finaal geoksideer word. Hier word $\text{NADH} + \text{H}^+$ gevorm

wat omgeskakel kan word na ATP d.m.v. oksidatiewe-fosforilering (Bieber *et al.*, 1982). In die lewer is die karnitiensisteem ook betrokke by ketogenese waar asetiel-KoA omvorm word na ketoonliggaampies wat dan dien as alternatiewe energiebron (Sann *et al.*, 1987).

2.3.2.2 Karnitien se rol by vrye KoA

Karnitien dien as buffer tussen die intrasellulêre vlakke van vrye koënsiem-A (KoA) en gebonde KoA (Bahl & Bressler, 1987). 'n Verlaagde asetiel-KoA/KoA verhouding, stimuleer piruvaatdehidrogenase en bevorder dus oksidatiewe verbruik van glukose (Siliprandi, 1986). Verder verseker die binding tussen L-karnitien en die asielgroep die vrystelling van KoA. Die KoA is nou beskikbaar vir reaksies in die Krebs siklus en gevolglik word die metaboliese fluks deur die Krebs siklus verhoog (Hülsmann *et al.*, 1964). Karnitien se reaksie met asiel-KoA verseker dat die poel van vrye KoA konstant bly (Harris *et al.*, 1987). As die vervaardiging van asetiel-KoA groter is as die kondensasie van asetiel-KoA met oksaloasetaat word die beskikbaarheid van vrye KoA bedreig.

2.3.2.3 Karnitien in detoksifiseringsreaksies

Karnitien neem deel in detoksifiseringsreaksies (Hodgson & Levi, 1994). Pasiënte met defekte in organiese suurmetsolisme induseer die konjugering van L-karnitien met sekere geakkumileerde metaboliëte vir ekskresie. Dit sluit onder andere asielkarnitiene in wat deur die ensiem asielkarnitientransferase gevorm word (Angelini *et al.*, 1992).

2.3.2.4 Karnitien bevorder energieproduksie

Karnitien speel 'n belangrike rol in die produksie van energie. Die energie word verkry van 'n aantal substrate soos vetsure, ketoonliggaampies, piruvaat, aminosure, ens. (Borum, 1986.) Lae asetielkarnitien konsentrasie stimuleer die oksidasie van endogene vetsure in die mitochondria van die lewer (Siliprandi *et al.*, 1965).

2.3.2.5 Karnitien bevorder lipied verbruik

L-karnitien mag vetsuur oksidasie bevorder deur 'n verhoging in die transport van vetsure. In die geval van karnitien gebrek mag hierdie faktor 'n rol speel in die kliniese beeld van pasiënte (Harris, 1987).

2.3.2.6 Karnitien bevorder ATP-translokasie

Adeniennukleotiedtranslokase is vatbaar vir inhibisie deur lang ketting asiel-KoA. Die inhibisie veroorsaak dat geen translokase van ATP vanaf die mitochondria na die sitoplasma kan plaasvind nie en gevolglik is daar nie voldoende ATP in die sitoplasma vir die katalise van ATP afhanklike reaksies nie. Die feit dat karnitien lang ketting asiel-KoA beskikbaar stel vir β -oksidasie, bevorder die verwydering van die moontlike inhibeering (Paulson & Shug, 1984).

2.3.2.7 Karnitien fasiliteer vertakte ketting α -ketosuuuroksidasie

Tydens vertakte ketting oksidasie is die dehidrogenase reaksie afhanklik van beskikbare KoA (Mathews & van Holde, 1990 : 738). Hierdie KoA's word deur middel van karnitien aangevul en gevolglik fasiliteer karnitien vertakte ketting α -ketosuur oksidasie (Engel & Angelini, 1973).

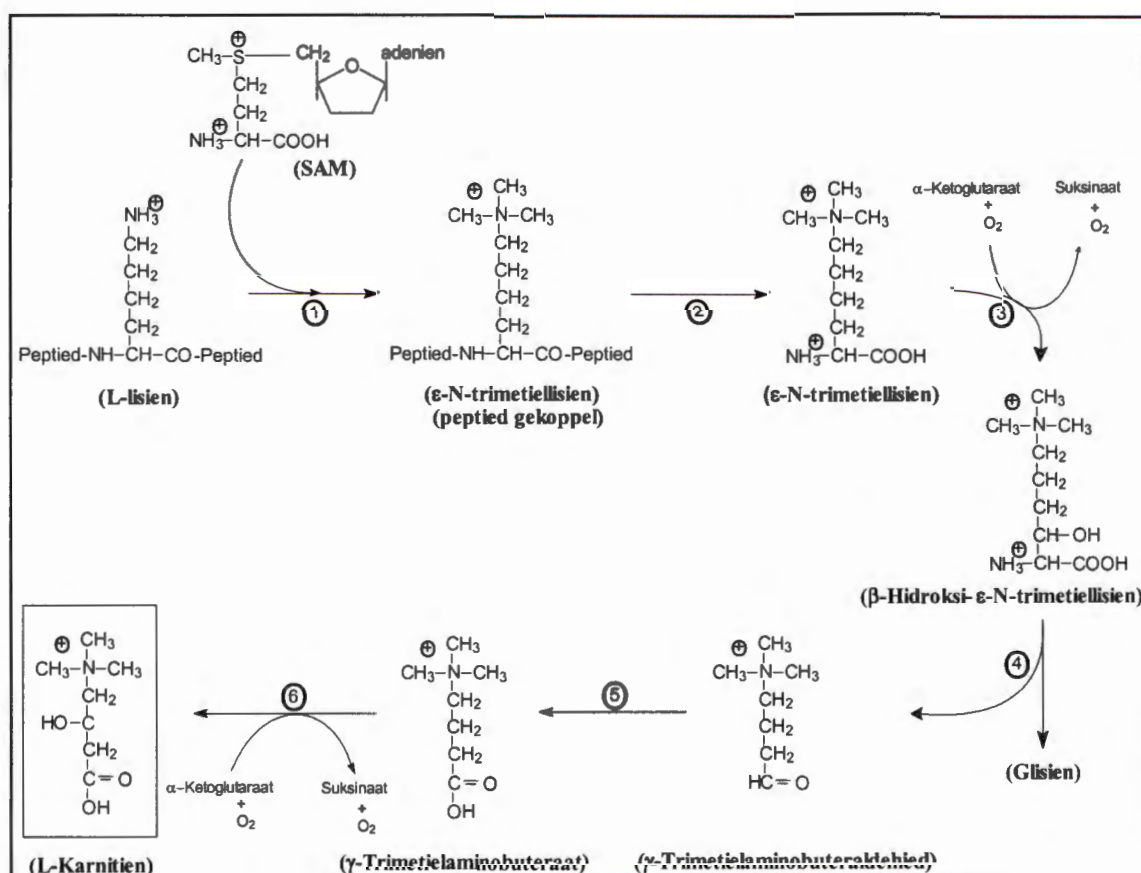
2.3.3 Karnitien ingestie en ekskresie

Karnitien word opgeneem vanuit die dieet. Absorpsie vanuit die verteringstelsel vind in die duodenum en ileum plaas deur aktiewe en passiewe diffusie (Hamilton *et al.*, 1986). Plantprodukte is laag in karnitien inhoud terwyl dierprodukte ryk is aan L-karnitien (Mitchell, 1978). Die vorme waarin karnitien in voedsel voorkom, sluit o.a. vrye-, kort en lang ketting vetsuuresters van karnitien in. Groot hoeveelhede karnitien wat ingeneem word, word bakterieël na trimetielamien afgebreek. Trimetielamien kan wel geabsorbeer word en word verder na trimetielamienoksied omvorm. Trimetielamien het 'n

kenmerkende vis-reuk en gevolglik kan hoë inname van karnitien oorsprong gee aan die onaangename reuk.

Uitskeiding van karnitien vind hoofsaaklik deur renale ekskresie (15 – 50 mg/dag) plaas (Cederblad & Lindstedt, 1971). Vrye karnitien het voorkeur bo asetiël-karnitien tydens herabsorpsie in die renale tubule (Rebouche & Mack, 1984).

2.3.4 Biosintese van karnitien



Figuur 2.3.c: Karnitienbiosintese. Ensiemreaksie (1)L-Lisienmetieltrasferase; (2)Proteinhidrolise; (3)ε-N-Trimetiellisienhidroksilase; (4)β-Hidroksi-ε-N-trimetiellisienaldolase; (5)γ-N-Trimetiellisienbuterielbetainaldehiddehidrogenase; (6)γ-Buterielbetainhidroksilase. (Siliprandi, 1986; Carter *et al.*, 1995).

Sedert die individuele ontdekkings van L-karnitien deur Gulewitch, Krimberg en Kutcher is baie nuwe bevindings al gemaak rondom die liggaamseie-verbinding. β-hidroksi-γ-trimetiellaminobuteraat word opgeneem vanuit die dieet met rou vleis as die rykste bron

van L-karnitien. (Mitchell, 1978). In die mens word L-karnitien ook gesintetiseer vanaf twee essensiele aminosure nl. lisien en metionien (Bremet *et al.*, 1963; Siliprandi, 1986).

Die biosintese weg (Sien fig 2.3.c.) begin met die trimetilering van lisien deur proteïen-afhanklike metieltransferase. S-adenosielmetionien tree op as die metielgroep verskaffer (Paik & Kim, 1971). Vrye lisien word nie gemetileer nie en die vrye trimetiellisien na proteïen degradasie, is nie beskikbaar vir proteïensintese nie. ε-N-Trimetiellisien dien nou as substraat vir die ensiem ε-N-trimetiellisienhidroksilase wat die hidroksilering uitvoer op die derde posisie in die ketting (Hulse *et al.*, 1978). Dit is die enigste mitochondriale ensiem en vereis α-ketoglutaraat, vitamien C en Fe²⁺ as kofaktore.

Die volgende ensiem in die weg is β-hidroksi-ε-N-trimetiellisienaldolase wat optree as katalisator vir die verwydering van glisien vanaf β-hidroksi-ε-N-trimetiellisien (Rebouche, 1992). Die ensiem vereis pirodoksaalfosfaat as kofaktor. Die produk van die reaksie is γ-trimietielaminobuteraldehyd wat nou as substraat dien vir γ-N-trimietielbuterielbetainaldehieddehidrogenase. Hierdie is 'n sitosoliese ensiem wat die vorming van γ-trimietielaminobuteraat vanaf γ-trimietielaminobuterielaldehied kataliseer (Hulse *et al.*, 1980). Laas genoemde vind in meeste selle plaas.

Die finale stap word behartig deur γ-buterielbetainhidroksilase en vereis ook α-ketoglutaarsuur, vitamien C en Fe²⁺ as kofaktore (Rebouche & Engel, 1991). Die sitosoliese ensiem skakel γ-trimietielaminobuteraat om na L-karnitien en kom net in 'n paar weefseltipes voor. In die mens is dit beperk tot die lewer en niere maar kan moontlik ook in die testis en die brein voorkom (Rebouch & Engel, 1980; Frenkel & McGarry, 1980). Weefseltipes soos miokardium en skeletspiere is dus totaal afhanklik van 'n karnitien transportsisteem vir karnitien voorsiening. In die mens is daar 'n toename in γ-buterielbetainhidroksilase aktiwiteit vanaf 12% in pasgebore baba's tot 100% van die normale aktiwiteit by 15-jariges (Rebouche *et al.*, 1980).

2.3.5 Karnitien transport en verdeling

Vir sekere weefsel is die karnitienvlakke direk gekoppel aan die vetsuuroksidasie aktiwiteit bv. miokardium en skeletspiere (Bohmer & Molstad, 1980). Dis egter vreemd dat die weefseltipes wat die rykste is aan karnitien nie in staat is om self karnitien te kan sintetiseer nie. Hiervoor word 'n transportsisteen benodig.

Weefsel karnitienvlakke is hoër as plasma karnitienvlakke. Dus is daar 'n aktiewe transport meganisme vanuit die plasma in die sel in. Sodra L-karnitien in sirkulasie is, word dit aktief in selle in getranspoteer deur 'n versadigbare membraangebonde transportsisteen (Sien figuur 2.3.b.) Passiewe diffusie vind ook plaas. (Goa & Brogden, 1987). Die karnitientransportproteïen (KTP) sorg dat intrasellulêre vlakke hoër is as plasmavlakke en toon geen voorkeur tussen die D- of L-isomeer nie (Bahl & Bressler, 1987).

Volgens literatuur is gevind dat die omsettyd van karnitien in verskeie weefsel soos volg is: 0,4 ure in niere, 1,3 ure in die lewer, 105 ure in skeletspiere, 21 ure in die hartspier en 220 ure in die brein (Brooks & McIntosh, 1975).

Die verspreiding van L-karnitien wissel van spesie tot spesie. Spierweefsel konsentrasies is 1mM in rotte (Brooks & McIntosh, 1975), 3-4 mM in mense (Carlin *et al.*, 1986; Harris *et al.*, 1987 & Lennon *et al.*, 1983), 7-8 mM in perde en 15 mM in skape (Snoswell & Koundakjian, 1972). Plasma konsentrasies van vrye karnitien wissel tussen 12-43 $\mu\text{mol/l}$ (Blau *et al.*, 1996). Vrye karnitienvlakke maak 70 tot 85 % uit van die totale liggaams karnitien konsentrasie (Marconi *et al.*, 1985; Angelini *et al.*, 1986). Manlike individue het hoër plasma karnitien vlakke as vroulike individue (Maebashi *et al.*, 1976). Daar is ook gevind dat tydens 'n toestand van rus, 40 tot 50 % van die vrye karnitien in die geasetileerde vorm teenwoordig is (Bremer, 1983). Die gemiddelde hoeveelheid karnitien in 'n normale manlike individu is 20-25g (spier massa $\pm$ 30 kg). Volgens Bremer (1983) word tussen 15 en 50 mg karnitien daaglik uitgeskei.

2.3.6 Karnitientransportproteïen (KTP)

Karnitienkonsentrasies in weefsel is normaalweg 20- tot 50-keer hoër as in serum (Stanley, 1987). Dit dui daarop dat opname teen 'n konsentrasie gradiënt moet plaasvind wat slegs moontlik is indien 'n aktiewe transport proses betrokke is.

Aangesien karnitien slegs in die lewer en niere volledig gesintetiseer word, moet hierdie aktiewe transportsisteen teenwoordig wees vir alle weefsel en staan bekend as die membraangebonde karnitientransportproteïen (KTP) (Bremer, 1983). Onderskeid word tussen 'n hoë en lae affiniteit transportproteïen in fibroblastselle getref (Tein *et al.*, 1990). Vir die hoë affiniteit transportproteïenreaksie, is die K_m -waarde vir die reaksie in fibroblaste $5,5 \pm 0,58 \mu\text{M}$ met die V -maks $3,4 \pm 0,36 \text{ pmol/min/mg}$ proteïen. By baie hoë karnitienkonsentrasie (10 mM) vertoon karnitientransport die bestaan van 'n lae affiniteit, hoë konsentrasie non-spesifieke diffusie opname (Tein *et al.*, 1990).

Tabel 2.3.1: Die kinetiese konstantes van karnitientransportproteïen in verskeie weefsel tipes

Weefsel tipe	Konsentrasie (nmol/g)	KTP - K_m ($\mu\text{mol/l}$)	
		Hoë affiniteit	Lae affiniteit
Hart	610-6000	5-60	
Skeletspier	1140-4600	60	585
Lewer	500-1900		5000
Niere	330-600	90	
Brein	500-1000		2000
Fibroblaste	0,7-1,5	2-5	
Plasma/Serum	37-73	-	-
Mioblaste		5-10	25-200
SVK		6	1000-2000

(Stanley, 1987; Rebouche & Engel, 1982; Bahl & Bressler, 1987; Treem *et al.*, 1988; Tein *et al.*, 1990; Bieber, 1988; Angelini *et al.*, 1992; Harper *et al.*, 1983; Eriksson *et al.*, 1989; Martinuzzi *et al.*, 1991; Brass, 1992).

Die transportproses van die plasmalemmale karnities transportproteïen is afhanklik van 'n Na^+ -gradient, energie en die teenwoordigheid van 'n vrye sulfhidriel groep (Tein *et al.*, 1996). Die geen wat kodeer vir KTP in die mens, is geleë op chromosoom 5q31.1-32 (Shoji *et al.*, 1998). Die cDNA van die geen, kodeer vir die organiese katioontransporter, OCTN2, wat omskryf word as die plasmalemmale karnities transportproteïen (Wu *et al.*, 1998). OCTN2 saam met OCTN1 vorm deel uit van 'n geïntegreerde groep organiese katioontransport integrale membraanproteïene wat 'n belangrike rol speel in detoksifisering, geneesmiddellekskresie en transplasentalettransport. Die prototipiese substraat is tetraetielammonium en hulle verskil van monoamientransporters en ATP-afhanklike multi transport proteïene (Grundemann, 1994). Dit is bewys dat OCTN2 die hoë affiniteit natrium-afhanklike transport van karnities kan behartig (Tamai *et al.*, 1998). Die OCTN2 geen bestaan uit 10 eksons en is ongeveer 30 kb groot (Wu *et al.*, 1998). Die volwasse mRNA is 3500 nukleotiedes groot en word algemeen uitgedruk in niere, spier- en plasentaweefsel. KTP is saamgestel uit 12 transmembraandomeine wat 'n glukose transport eienskap en nukleotied bindingsvouingsmotief insluit (Wu *et al.*, 1998; Tamai *et al.*, 1998).

'n Mutasie in die geen 5q31.1-32 lei tot primêre karnitiendefek (Wang *et al.*, 1999). Volgens Wang *et al.* (1999), in 'n studie van 'n homosigotiese en heterosigotiese pasiënte met "nonsense" mutasies, is 1-bp invoegingsmutasies wat 'n STOP kodon veroorsaak en 1-bp deleisie mutasies wat 'n leesraam verskuiwing en premature terminasie kodon veroorsaak, die oorsaak vir die presentering van pasiënte met primêre karnitiendefek is. Die gevolg van die mutasies is onstabiele mRNA's wat na translasie 'n verkorte membraantransportproteïen met ses, agt en nege transmembraan domeine lewer in plaas van 12. Die proteïen is vinnig degradeerbaar en nie-funksioneel (Wang *et al.*, 1999). Soortgelyke bevindinge is ook gemaak deur Tang *et al.*, (1999), waar "missense" mutasies en vervangingsmutasies ook gelyk het tot 'n nie-funksionele transportproteïen.

2.3.7 Karnitiendefekte

Die eerste karnitiendefek is beskryf deur Engel & Angelini (1973). Die pasiënt het spierswakheid vertoon. Op 19-jarige ouderdom het dit drasties vererger en gepaard gegaan met lipieddeponering in die meeste weefsels. Hierdie geval het gelei tot verskeie

diagnoses van karnitiendefekte in individue en sedertdien is baie pasiënte al gediagnoseer met soortgelyke defekte in die karnitienmetabolisme.

Volgens Goa & Brodgen (1987) het 'n defek in die karnitienmetabolisme 'n tweeledige gevolg. Eerstens ontstaan verlaagde energievlakke in die sel a.g.v. die akkumilering van vrye vetsure in die sel. Die vetsure kan nie aan die Krebs-siklus deelneem nie, aangesien die mitochondriale membraan ondeurlaatbaar is vir vrye vetsure. Tweedens het akkumilering van die vrye vetsure en asetiel-KoA 'n toksiese uitwerking op die sel se homeostase.

Moontlike oorsake van karnitiendefeksindroom kan toegeskryf word aan (Frenkel & McGarry, 1980):

1. onvolledige biosintese
2. belemmerde aktiewe transport van karnitien in die sel in
3. oormatige ekskresie uit selle
4. oormatige verlies van karnitien
5. oormatige katabolisme

Studies in verskeie pasiënte het getoon dat die genetiese defek van die plasmalemma karnitientransportproteïen (KTP) al die weefsels, fibroblaste, hart-, spier- en nierweefsel aantast (Treem *et al.*, 1988; Tein *et al.*, 1990 & Stanley *et al.*, 1991).

Onderskeid word getref tussen verskeie vorme van karnitiengebreksindroom. Die klassifikasie sal vervolgens bespreek word:

2.3.7.1 Primêre Karnitiendefek

'n Primêre karnitiendefek is 'n outosomale resessiewe defek, wat tot 'n defektiewe karnitiendraerproteïen (KTP) in die selmembraan lei en gevolglik verlaagde intrasellulêre karnitienvlakke (Cruse *et al.*, 1984). 'n Direkte gevolg hiervan is skielike energie tekort a.g.v. die liggaam se onvermoë om energie vry te stel uit lipiede. Die geïnduseerde

energie tekort tesame met ander metaboliese kondisies soos hipotonia, hartstilstand en soms wiegiedood kan lei tot die dood van 'n pasiënt (Angelini *et al.*, 1992).

Die kliniese beeld van so 'n pasiënt behels nie-ketotiese hipoglukosemie, Reye-sindroomsimptome, skelet- en hartspiermiopatie (Roe & Coates, 1995; Pons & De Vivo, 1995). Heterosigotiese ouers van pasiënte ervaar gedeeltelike verlaagde plasma karnitienvlakke a.g.v. verhoogde karnitienekskresie in uriene (Scaglia *et al.*, 1998).

Primêre Karnitiendefekte word in twee groepe verdeel:

1. Karnitiendefek met miopatie – ontstaan wanneer die transportmeganisme vir karnitien in spierweefsel en renale reabsorpsie defek is. Gewoonlik is plasma karnitienvlakke normaal met verlaagde intrasellulêre vlakke in die geaffekteerde spierweefsel (Treem *et al.*, 1988). Dit het tot gevolg dat spierswakheid intree a.g.v. spierweefsel se onvermoë om karnitien in te transporteer. Biochemiese merkers wat gebruik kan word tydens diagnose, is onder andere dat na eksogene aanvulling van karnitien, palmitiensuuroksidasie herstel na normaal in homogenetiese individue. Ten spyte van die normalisering van die metabolisme, vertoon die karnitienvlakke steeds verlaag te wees (Angelini *et al.*, 1991).
2. Sistemiese karnitiendefek – word gekenmerk aan lae karnitienvlakke in meerdere weefselgroepe as slegs spierweefsel (Goodman *et al.*, 1991 : 1545-1552). Volgens Dipalma (1988:38) kan 'n sistemiese defek die gevolg wees van 'n defektiewe karnitiensintese. Die simptome behels akute episodes van enkefalopatie met hepatiese disfunksie, hipoglukosemie en Reye-tipe sindroom. Progressiewe spier swakheid en oormatige lipied deponering in spier- en ander weefsel kom ook voor wat gepaard gaan met verlaagde karnitienvlakke in die lewer, spierweefsel en serum (Frenkel & McGarry, 1980). 'n Drastiese verlies aan karnitien kom ook voor a.g.v. 'n renale lekkasie waar die renalesel karnitientransporter defek is. Dit veroorsaak dat liggaamsstore vinnig uitgeput word en dra by tot die karnitiengebrek (Eriksson *et al.*, 1989). Die simptome kan sodanig vererger dat die dood van pasiënte kan intree. Dit

gebeur as gevolg van akute simptomatiese aanvalle van enkefalopatie en hipoglukosemie met verlaagde energie beskikbaarheid. Die liggaam aktiveer vetsuuroksidasie en glukoneogenese om energie te verkry. Moontlike verbruik van vertakte ketting aminosure kan ook plaasvind. Akkumilering van die metaboliete en dikarboksielsure vanaf ω -oksidasië van vetsure en laktaat vanaf glukogenoliese lei tot metaboliese asidose. Dus die akkumilering van toksiese metaboliete, enkefalopatie, hipoglukosemie, asidose en 'n kombinasie van die en ander faktore lei tot die dood van die pasiënt (Frenkel & McGarry, 1980).

2.3.7.2 Sekondêre Karnitiendefek

'n Sekondêre defek van die karnitienmetabolisme ontstaan as gevolg van ander metaboliese en renale tubulêre defekte (Goodman *et al.*, 1991). Pasiënte met aangebore metaboliese defekte van die organiesesuurmetabolisme, meervoudigekarboksilase defek, dikarboksielsuur defekte, MKAD, SKAD, isovaleriaan en propioonasidemie ens. presenteer met 'n sekondêre karnitiendefek (Chalmers *et al.*, 1984). Die metaboliese defekte veroorsaak akkumilering van sekere metaboliete a.g.v. blokkasies in die normale metabolisme. Die akkumilering van defek geassosieerde metaboliete veroorsaak 'n wanbalans tussen die geasetileerde vorm van KoA en vrye KoA (Engel & Rebouche, 1984). As gevolg van die ophoping van asiel-KoA thioesters vind karnitiengekonjugering en ekskresie van die metaboliete plaas. Die verhoogde ekskresie van gekonjugeerde karnitienmetaboliete tesame met defektiewe re-absorpsie in die niere, veroorsaak grootskaalse verlies aan endogene karnitien (Engel *et al.*, 1981). Dit lei tot 'n sekondêre karnitiengebreksindroom wat presenteer met simptome van verlaagde plasma- en weefsel karnitienvlakke en verhoogde vlakke van gekonjugeerde karnitienmetaboliete, wat sekondêr gevorm word om akkumilerende toksiese metaboliete te verwyder.

2.3.8 Behandeling van Defekte

Karnitiengebreksindroom kan behandel word. Dit vereis vroeë diagnose sodat skade tot die minimum beperk kan word. Die behandeling behels 'n hoë dosis orale karnitien aanvulling wat lei tot vinnige kliniese verbetering in kardiaale funksie, krag en groei (Tein

et al., 1990; Stanley *et al.*, 1991). 'n Aanvanklike dosis van 100 mg/kg/dag word gebruik en die ekskresie van karnities word noukeurige gemonitor in die pasiënt om die dosis aan te pas (Angelini *et al.*, 1992). Dosis so hoog soos een g/kg/dag is al suksesvol aangewend. Karnitienaanvulling maak 'n verskil in pasiënte met 'n primêre karnitiendefek terwyl pasiënte met sekere sekondêre karnitiendefekte 'n skrale verbetering toon (Tein *et al.*, 1990). Dis egter nog debateerbaar watter sekondêre karnitiendefekte, kronies of akute, voordeel uit behandeling trek (Stanley, 1987). Die rede vir die verbetering na karnitienaanvulling kan gevind word in die feit dat plasma karnitienvlakke drasties verhoog na ingestie. Aangesien primêre karnitiendefekte veroorsaak word deur die defekte hoë affiniteits transportsisteen veroorsaak die verhoogde plasma karnities konsentrasie dat karnities deur die lae affiniteits transportsisteen in die sel in getranspoteer word. Dit verhoog die intrasellulêre karnitienvlakke tot so 'n mate dat normale vetsuuroksidasie weer kan plaasvind (Angelini *et al.*, 1992). Die klein verandering veroorsaak dat die intrasellulêre metabolisme weer geaktiveer word met gedeeltelike verligting van simptome.

2.3.9 Nuwe effekte van karnitientherapie

Aangesien die laë affiniteits transportsisteen 'n rol speel tydens karnitientherapie word daar gepoog om die karnitienvlakke in die bloed so hoog as moontlik te kry. Nuwe effekte, in die geval diaree en die ontstaan van 'n onaanvaarbare visreuk, maak dit egter nie moontlik om baie hoë vlakke te bereik nie en beperk dus die effektiwiteit van die behandeling. In die studie word 'n ondersoek ingestel na die gebruik van 'n karnitien-adamantaankompleks wat die potensiaal het om beter getranspoteer te word en gevolglik hoër vlakke te bereik sonder die genoemde nuwe effekte van suiwer karnities terapie.

HOOFSTUK 3

METODES

3.1 INLEIDING

Die doel van die studie is om te bepaal of konjugate van karnitien met adamantaan en adamantaanderivate aangewend kan word vir die verbeterde transport van karnitien. Die benadering kan 'n toepassing vind in primêre sowel as sekondêre karnitiendefekte.

Om in die doel van die studie te slaag was dit nodig om die volgende eksperimentele bepalinge uit te voer:

(1) Sintese en suiwering van karnitien konjugate met adamantaan en adamantaanderivate. Daar is verskeie adamantaan-derivate bekend. Vir die doel van die studie is op 1-adamantaankarboksielsuur, 1-adamantaanasynsuur en 2-amantadien besluit. Die keuse van bogenoemde verbindings is alleenlik gegrond op die feit dat die verbindings reeds met sukses gebruik is as transport fasiliteerders.

(2) Aangesien die beoogde adamantaankarnitien konjugate oraal toegedien sal word was dit noodsaaklik om die absorpsie van die verbindings te bepaal. Vir die doel is beladings van *Sprague Dowley*-rotte gebruik. Die teenwoordigheid van die konjugate asook vrye karnitien is in die bloed en uriene van die rotte gevolg wat aanduiding kan wees van absorpsie, die mate van hidrolise in die bloed en uitskeiding deur die niere.

(3) Transport oor selmembrane is nie noodsaaklik nie, maar kan wel voordelig wees in die geval van karnitientransportdefek. Die moontlikheid dat die karnitien-adamantaan-konjugaat oor die selmembrane getranspoteer kan word, is bepaal deur die gebruik van fibroblaste. Vir die doel is fibroblaste verkry van 'n pasiënt met 'n bekende aangebore defek van die transportproteïen. Die effek van die adamantaankarnitien-konjugate is

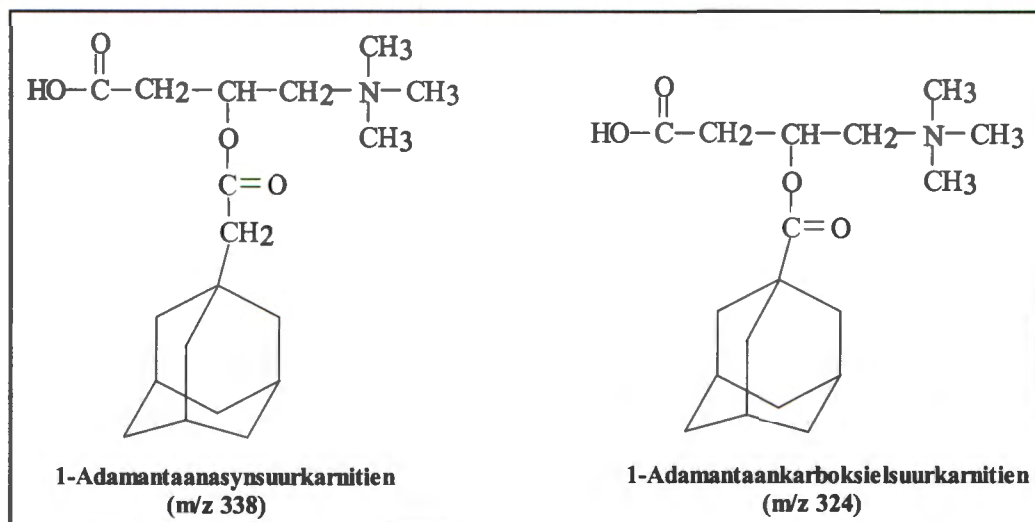
bepaal deur die oksidasie van vetsure te monitor. Verhoogde karnitienvlakke sal in die geval β -oksidase bevoordeel en kan dus 'n aanduiding wees van suksesvolle transport van karnitien deur middel van die adamantaankarnitien konjugate.

3.2 CHEMIESE SINTESE: ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE

Vir die sintese van die nuwe konjugate wat aangewend is om die hipotese te toets is twee verskillende metodes gebruik. Vervolgens sal die twee metodes individueel bespreek word.

3.2.1 1-Adamantaankarboksielsuur- en 1-adamantaanasynsuur-karnitien

Beide die adamantaankarnitien verbindings (Fig. 3.2.1) is chemies gesintetiseer volgens die metode van Ziegler *et al.*, (1967). Sien asseblief bylaag B.1.1 vir 'n lys van die reagentse benodig in die sintese. Voordat die sinteseproses begin is, is die L-karnitien gedroog deur dit te reflux in benseen, om te verseker dat geen water vasgevang bly in die kristalstruktuur nie. Die water in die struktuur kan moontlik lei tot verlaagte opbrengste en veral gesien dat L-karnitien baie higroskopies is, is droging uiters belangrik. 'n Mengsel van 2 g (0,011 mol) vrye adamantaankarboksielsuur of adamantaanasynsuur en 0,1 ml (0,011 mol) tionielchloried is vir drie ure verhit by 80 °C, terwyl dit aanhoudend geroer is. Vir die duur van die sintese is die temperatuur konstant gehou. Na die drie ure is 'n tweede mengsel van 2,1 g (0,011 mol) L-karnitien in 1,814 g (0,011 mol) trichloorasynsuur (50 °C) by die mengsel gevoeg en vir 'n verdere drie ure by 80 °C geroer. Die produkvorming is gemonitor deur van ESI-MS-MS gebruik te maak. Die moederione van belang was $m/z = 324$ en 338 . Die kondisies vir die ESI-MS-MS analise is beskryf in afdeling 3.2.3. Die opbrengs van 99% en hoër het toegelaat dat geen suiweringsprosedure nodig was nie.



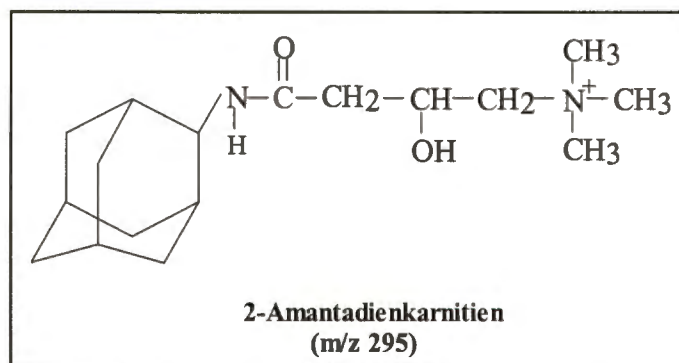
Figuur 3.2.1 Die gesintetiseerde adamantaankarnitien-konjugate

3.2.2 2-Amantadienkarnitien

Die sintese van die 2-amantadienkarnitien (Fig 3.2.2) berus op die metode eerste beskryf deur Sheehan & Hess (1955). Die metode is later aangepas deur König & Geiger (1970). Sien bylaag B.1.1 vir 'n lys van die reagentie benodig tydens die sintese. L-karnitien en disikloheksielcarbodiimied (DCC) is voor die aanvang van die sinteseproses gedroog vir 24 uur onder vakuum. Twee oplossings is voorberei. Oplossing A het bestaan uit 0,473 g (2 mol) hidroksibenzotriazool (HoBt) en 0,638 g (2 mol) DCC, wat saam gevoeg is en opgelos in genoeg dietielformamied (DEF). Oplossing B het bestaan uit 0,25 g (1 mol) L-karnitien en 0,235 g (1 mol) 2-Amantadien, wat saam gevoeg is en opgelos is in voldoende DEF. Oplossings A en B is saam gevoeg in 'n reaksiefles toegerus met 'n CaCl₂-buis en geroer by 25 °C vir drie ure of totdat 'n homogene oplossing verkry is.

Die ekstraksie en suiwering van die produk vanuit die reaksiemengsel is gedoen volgens 'n metode beskryf deur Tsuzuki *et al.*, (1994). Aangesien DCC tydens die sinteseproses omgeskakel word na die onoplosbare DCU (disikloheksielurea) verbinding, kan die oormaat DCU verwyder word deur presipitasie en filtrasie. Die oormaat DCU is

gepresipiteer met dietieleter en met 'n sinterglasfilter gefiltreer. Die prosedure is 'n paar keer herhaal om maksimum opbrengs te verseker. Die oorblywende reaksiemengsel is met 'n omgekeerde fase C₁₈-kolom geïsoleer deur chloroform (sien B.1.1) as mobiele fase te gebruik. Die chloroform is as fraksies versamel en geanaliseer met ESI-MS-MS. Die kondisies vir die ESI-MS-MS-analise is beskryf in afdeling 3.2.3. Die massaspektrum is verkry en suiwerheid is bepaal opgrond van die moederioon ($m/z = 295$). Die fraksies wat suiwer amantadienkarnities bevat het is gebruik.



Figuur 3.2.2 Gesintetiseerde 2-amantadienkarnities-konjugaat

3.2.3 Kondisies van elektrospoei tandem massaspektrometrie (ES-MS-MS) vir adamantaankarnities-konjugaat analises

Tydens die sinteseproses is die produkvorming gemonitor met behulp van massaspektrometrie. Die apparatuur wat hiervoor gebruik is, is 'n VG Quatro II tripel kwadрупool massaspektrometer (Micromass, UK) en bestaan uit 'n tandem massaspektrometer met 'n elektron spoei ionisasie bron (ESI-MS-MS).

Massaspektrometrie behels die opbreek van verbindings om sodoende gefragmenteerde ione te lewer, wat elk geskei kan word opgrond van die verskil in massa van elke fragment. So 'n massaspektrum word gebruik om verskillende verbindings te identifiseer, aangesien elke verbinding oor 'n unieke samestelling en massa beskik.

Gewone massaspektrometrie het 'n nadeel in die sin dat verbindings met dieselfde massas, nie van mekaar onderskei kan word nie. Gevolglik is tandem massaspektrometrie ontwikkel en bestaan uit twee massa-analiseerders (MS1 en MS2) wat verbind is met mekaar deur 'n botsingssel. In die toepassing word 'n spesifieke piek (moederioon) in die massaspektrum geselekteer (MS1) vir verder ondersoek in MS2. Die geselekteerde ioon van die spesifieke piek beweeg deur na 'n botsingssel waar verdere fragmentasie plaasvind deur die botsing van die ioon en 'n botsingsgas, bv. argon. Die 'n proses staan bekend as botsings geïnduseerde fragmentasie (CID). Die gefragmenteerde ioon beweeg deur na MS2 waar 'n tweede massaspektrum saamgestel word. Die pieke teenwoordig staan bekend as dogterione. Tandem MS is dus baie handig vir die absolute identifisering van verbindings.

Vir hierdie spesifieke analise is gebruik gemaak van elektrosprei ionisasie (ESI). Die ionisasietegniek het die voordeel dat milde ionisasie kondisies heers, met min fragmentasie wat plaasvind. Die beginsel berus op ionisasie van 'n verbinding deur die monster in klein druppeltjies op te breek (nebulisering). 'n Stadig vloeiende stikstofgas is teenwoordig wat gevolglik die oplosmiddel verwyder terwyl die monster gedroog word totdat net die verbinding van belang oorbly. Indie proses word 'n lading geïnduseer op die verbinding van $M+1$ (M = massa). In die toepassing is positiewe ionisasie gebruik.

Die volgende parameters is gebruik tydens die analise:

Tabel 3.2.3: Kondisies vir MS-analise

Bron : ES+	
Kapilêr	3.5 kVolts
HV lens	0.5 kVolts
Koniese lens	30 Volts
Uitsluitingslens- teenrekening	5 Volts

Uitsluitingslens	1.5 Volts
RF lens	0.2 Volts
Brontemperatuur	60 °C

	MS1	MS2
Ioon energie	1.0 Volts	1.6 Volts
LM resolusie	15.0	13.5
HM resolusie	15.0	13.5
Lens	(# 5) : 100 Volts	(# 7) : 250 Volts
	(# 6) : 5 Volts	(# 8) : 40 Volts
		(# 9) : 0 Volts
Vermenigvuldiger	750 Volts	750 Volts
Druk : Analiseerder (Vakuum)	1.4e-5 mBar	1.4e-5 mBar
Druk : Gassel	2.0e-5 mBar	2.0e-5 mBar

3.3 BELADING VAN PROEFDIERE MET KARNITIENKONJUGAAT

Die doelstelling van die beladingsanalise is om te bepaal of vrye karnitienvlakke in bloed verhoog kan word na die inname van adamantaan-karnitien-konjugate. Vir die *in vivo* evaluering van die hipotese is daar besluit om die *Sprague Dawley*-rot te gebruik. Die goedkeuring van die protokol vir die gebruik van proefdiere is verkry vanaf die P.U vir C.H.O se navorsingskomitee (Mediese Evaluasie Sub-kommittee vir Eksperimentele Diere) voordat daar met die projek voortgegaan is. Die afdeling van die eksperimentele protokol is uitgevoer in die fasiliteite soos verskaf deur die Proefdier Navorsings Sentrum en die rotte se aanhouding het plaasgevind onder gekontroleerde kondisies in die bg.

sentrum. Die diere is voor en na die eksperimente aangehou in groepe van vier, met voldoende water en 'n gebalanseerde dieet.

3.3.1 Eksperimentele opstelling

Daar is gebruik gemaak van agt manlike rotte (ongeveer 300g), twee rotte per adamantaankarnitien-konjugaat dosering. Die rotte is elkeen oorgeplaas in individuele metabolismehokke voor die aanvang van die analise met voldoende water en gekontroleerde omgewingskondisies. Die dosering (4 mg/kg) van elke rot is gedoen net na die basale-waarde monster (tyd 0) geneem is. Die konjugate is opgelos in 500 μ l propileenglikool. Die rotte is oraal gedoseer. Elke rot het gedien as sy eie kontrole (tyd = 0) en die monster versameling is gedoen oor 'n tydperk van 12 ure. Bloed- en urienmonsters is op die volgende tye geneem: 4 uur, 8 uur en 12 uur na dosering. Die urienmonsters is apart van die fesus versamel en is gestoor by -20°C tot die dag van analise. Bloed is ook elke vier ure verkry vanuit die dorsale arterie in die stert, deur gebruik te maak van Guthrie-kaarte soos beskryf deur Johnson (2000).

3.3.2 Karnitienanalises

3.3.2.1 Bloed karnitienanalise

Die karnitienanalise is uitgevoer op die Guthrie-kaarte soos beskryf deur Johnson, (2000). Twee gaatjies is uitgepons en elkeen verteenwoordig $\pm 7 \mu\text{l}$ bloed. Die twee stukkies papier is geplaas in 500 μl oplosmiddel (sien B.1.10) wat die interne standaard (stabiele isotope) bevat en laat staan vir 30 minute om die karnitien op te los. Hierna is die stukkies papier verwyder en die monster met N_2 -gas gedroog by 70°C . Die monsters is gebuteleer met 3N butanoliese-HCl by 70°C vir 30 minute. Die monster is daarna weer gedroog met N_2 -gas. Die gedroogde monster is opgelos in 'n geskikte oplosmiddel

(sien B.1.11) en geanaliseer met massaspektrometrie (ESI-MS-MS). Die dogterione van belang is $m/z = 218$ en $m/z = 260$.

3.3.2.2 Urien karnitienanalise

Die kreatinienwaardes van elke urienmonster is bepaal met 'n Technicon RA-100™ apparaat volgens die metode soos voorgeskryf deur die verskaffers. Die kreatinienwaardes is in berekening gebring tydens die kwantifisering van die konsentrasie van vrye karnitien in die uriene.

Om te verseker dat geen soliede partikels die analise beïnvloed nie, is die uriene met 'n 0,22 μ -filter gefiltreer. 'n Volume van 10 μ l uriene is geneem en 500 μ l interne standaard oplossing (sien B.1.10) is bygevoeg. Die monster is gedroog met N_2 -gas by 70 °C. Na die droging is die monsters gebuteleer met 3N butanoliese-HCl by 70 °C vir 30 minute lank en daarna weer gedroog met N_2 -gas. Die gedroogde monster is opgelos in 'n geskikte oplosmiddel (sien B.1.11) en geanaliseer met massaspektrometrie (ESI-MS-MS). Die dogterione van belang was $m/z = 218$ en $m/z = 260$.

3.3.3 Kondisies van elektrospoei tandem massaspektrometrie (ES-MS-MS) vir karnitienanalises

Die urien en bloedmonsters van bg. proefdiere is geanaliseer met dieselfde massaspektrometer (ESI-MS-MS) as in afdeling 3.2.3. Die kondisies vir die analises was as volg:

Tabel 3.3.3: Kondisies vir MS-analise

Bron : ES+	
Kapilêr	3.5 kVolts

HV lens	0.5 kVolts
Koniese lens	35 Volts
Uitsluitingslens- teenrekening	5 Volts
Uitsluitingslens	1.5 Volts
RF lens	0.2 Volts
Brontemperatuur	60 °C

	MS1	MS2
Ioon energie	1.0 Volts	1.6 Volts
LM resolušie	13.5	13.5
HM resolušie	13.5	13.5
Lens	(# 5) : 100 Volts	(# 7) : 250 Volts
	(# 6) : 5 Volts	(# 8) : 40 Volts
		(# 9) : 0 Volts
Vermenigvuldiger	750 Volts	750 Volts
Druk : Analiseerder (Vakuum)	2.9e-5 mBar	2.9e-5 mBar
Druk : Gassel	1.2e-3 mBar	1.2e-3 mBar

3.4 TRANSPORTSTUDIE VAN ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE IN FIBROBLASTSELKULTURE

Volgens Bergstrom *et al.*, (1991) beskik adamantaan oor die vermoë om maklik oor membrane te beweeg. Om die eienskap te bevestig, is fibroblastselle opgekweek en gebruik om te bepaal of die adamantaankarnitien-konjugaat oor die sellulêremembraan getranspoteer word. Verder is die β -oksidase aktiwiteit gemeet om te bepaal of die

adamantaan-karnitien-konjugaat lei tot verhoogde L-karnitienvlakke wat β -oksidasie van vetsure sal verhoog.

3.4.1 Kweking van fibroblastselkulture

Die fibroblastselle is opgekweek in Ham se F12 medium (Gibco) met die byvoeging van 10 % (v/v) fetale kalfserum en antibiotika (sien B.1.3). Die selle is by 37 °C geïnkubeer in 'n inkubator met 5 % (v/v) CO₂ in steriele 25cm² flesse (NUNC). Die selle is toegelaat om te groei totdat 'n univorme monolaag selle waargeneem kon word. 'n Fasekontrasmikroskoop is gebruik om die groei van die weefselkulture te monitor.

Die glasware wat gebruik is tydens die uitvoering van die projek is baie noukeurig gewas sonder die gebruik van enige detergente. Die flesse is uitgespoel met gedistilleerde water waarna dit geoutoklaveer is en in 'n oond by 100 °C gedroog is.

3.4.2 Voorbereiding van fibroblastselle vir analise

Vir die analise van β -oksidasie aktiwiteit in fibroblast weefselkulture moet die selle gesond en in 'n aktiewe groeifase wees. Die weefselkulture is 24 uur voor gebruik gekondisioneer met vars media sonder antibiotika (sien B.1.3). Direk voor die aanvang van die analise is die selle drie keer met 'n 1 x PBS oplossing (sien B.1.2) gewas. Die selle is met 4 ml steriele tripsien/EDTA (sien B1.4) behandel en vir 5-7 minute by 37 °C geïnkubeer (Nolte *et al.*, 1997). Die tripsien is met medium sonder antibiotika vervang en die fles is liggies geskud om al die selle van die bodem los te maak. Die getripsineerde selle is in polipropileenbuisse versamel, waarna die buise vir 'n halfuur in 'n 37 °C waterbad geïnkubeer is om die selmembrane kans te gee om te herstel. Hierna is die selle twee keer met 1 x PBS gewas en elke keer is die selle weer gepresipiteer deur dit te sentrifugeer vir 5 minute teen 400 x g. Dit is gevolg deur die selle weereens in 1 x PBS te suspendeer tot 'n finale konsentrasie van 1 mg/ml proteïen. Die selsuspensie ($\pm$ 25 μ g selproteïen per put) is oorgedra in 'n 24-put mikrotiter-plaat tesame met 200 μ l

antibiotika vrye media (sien B.1.3) in elke put en oornag geïnkubeer by 37 °C. Die proteïenkonsentrasie vir elke put is bepaal deur gebruik te maak van die bicinchoniniensuur-metode (Smith *et al.*, 1985).

3.4.3 β -oksidasie analise

Die β -oksidasie analise is gebaseer op die oorspronklike metode van Ronald Wanders, Departement Pediatrie, Amsterdam Mediese Sentrum (1994). Vir die analise is daar van twee sellyne gebruik gemaak. Die eerste sellyn, M, is verkry van 'n normale individu met geen β -oksidasie afwyking nie. Die tweede sellyn, D, is verkry van 'n pasiënt waarvan daar 'n positiewe diagnose gemaak is vir 'n karnitientransportdefek. Die analise is uitgevoer in 'n 24-put mikrotiter plaat. Elke reaksie is in duplikaat uitgevoer en die samestellinge van die reaksiemengsel sien soos volg daaruit:

Tabel 3.3.1: Die samestelling van die inkubasiereaksies

Reaksie	Fibroblast sellyn	Substraat	Adamantaan-Karnitien-Konjugaat
A (Blanko)	Geen	400 μ l	Geen
B (Normaal)	M	400 μ l	Geen
C (Pos. Kontrole)	D	400 μ l	Geen
D (Proef)	D	400 μ l	1-Adamantaan-karboksielsuur-karnitien
E (Proef)	D	400 μ l	1-Adamantaan-asynsuur-karnitien
F (Proef)	D	400 μ l	2-Amantadien-karnitien

Die monolaag fibroblastselle in elke reaksieput is gepreïnkubeer vir 30 minute met 1 ml glukose/glutamien vrye medium (RPMI-medium, sien B.1.7), voor die analise om die selle te kondisioneer. Die analise is begin deur die inkubasiemengsels vir elke reaksie by te voeg en die reaksieplaat te inkubeer vir vier ure by 37°C in 'n inkubator met 5 % (v/v) CO₂. Die samestelling van die inkubasiemengsels het bestaan uit die substraat, [9,10-³H]-palmitiensuur (sien B.1.7), met 'n totale inkubasievolume van 400 µl en 1,0 mM adamantaankarnitien-konjugate. Na die vier ure inkubasieperiode is die reaksie gestop deur die reaksieplaat op ys te plaas. Die inkubasiemengsel is gebruik vir die verdere β-oksidasie analise.

Om te verseker dat die ongemetaboliseerde [9,10-³H]-palmitiensuur nie die resultate beïnvloed nie is dit verwyder met behulp van 'n ioonchromatografie. 'n Anioonuitruilingskolomopstelling is vir elke reaksiemengsel voorberei deur die gebruik van anioonuitruilingshars (sien B.1.8). Die opstelling is gekondisioneer deur dit herhaalde kere met water te was. Die inkubasiemengsel is op die kolom gebring en gespoel met 200 µl PBS (sien B.1.2). Die kolom is geëluëer met twee volumes water en die fraksies is opgevang vir onmiddellike telling.

Die aktiwiteit is bepaal deur 5ml sintillasie telvloeistof (sien B.1.9) by die geelueerde fraksies te voeg. Die monsters is getel met 'n Beckman vloeistofsintillasieteller. Die tellings (**dpm**) van elke reaksie is gekwantifiseer. Die proteïenkonsentrasie is in berekening gebring. Die finale aktiwiteit is bereken deur die volgende formule te gebruik:

$$\text{Aktiwiteit} = (\text{dpm-blanko}) \times (\text{pmol/dpm} / 2 / \mu\text{g})$$

Die finale aktiwiteit word weergegee as **nmol/h/mg**.

3.4.4 Vrye L-karnitienanalise in fibroblastselkulture

Die oorblywende fibroblast selle in die reaksieputte is behandel met 200 μ l van 'n 0,5% Triton x100 oplossing. Dit is gedoen om te verseker dat die selle loskom van die reaksieflesbodems af vir verdere analise. Van die beskikbare 200 μ l is 40 μ l gebruik in die proteïen bepaling en 160 μ l van die selsuspensie gebruik om te bepaal of intrasellulêre karnitienkonsentrasies verander het.

Die 160 μ l reaksiemengsel is gesuspendeer in 2 ml van 'n 10 x PBS-oplossing (sien B.1.2) en die selle is gepresipiteer teen 500 x g by 25 °C d.m.v. 'n Roto-Unit tafelsentrifuge. Die supernatant is gedekanteer en die presipitaat is drie keer met PBS-oplossing gewas. Nadat die selle gesuspendeer is in 1 ml H₂O dd, is die selle geliseer deur 'n vries-ontdooi prosedure by -80 °C. Die reaksiemengsel is aangevul met 100 μ l van 'n karnitienisotoopoplossing (sien B.1.10) wat ook as interne standaard vir die kwantifisering van vrye karnitien dien. Die reaksiemengsel is deeglik geskud om te verseker dat alles in oplossing is. Na presipitasie van die geliseerde selreste is vloeistoffase behou en gedepteïneer deur die oplossing te filtreer met 'n 0,22 μ -fliter. Die reaksiemengsel is gedroog onder N₂-gas en dieselfde prosedure is gevolg as reeds bespreek onder 3.3.3 om die monster voor te berei vir ESI-MS-MS analise (sien 3.3.3).

3.5 BEPALING VAN ESTERASE AKTIWITEIT MET ADAMANTAANKARNITIEN KONJUGAAT AS SUBSTRAAT

Vir 'n verbindings om geskik te wees vir verdere prekliniese studies, moet die verbinding oor sterk weerstandbiedende eienskappe teen ensiemaafbraak beskik (Chan *et al.*, 1996). Die moontlikheid bestaan dat die ensiem esterase wat algemeen in bloed voorkom die premature hidrolise van twee van die gesintetiseerde produkte kan kataliseer. Beide 1-adamantaankarboksielsuur-karnitien en 1-adamantaanasynsuur-karnitien-konjugate

beskik oor ester-bindings wat moontlik as substraat vir bogenoemde ensiem kan dien. Eenvoudige opstelling is gemaak om voorlopig te bepaal of die konjugate onder bespreking weerstandbiedend is teen esterase ensiem hidrolise.

3.5.1 Eksperimentele prosedure

Vir die opstelling is beide die adamantaan-karnities-konjugate en natuurlike substraat as substrate in die analise gebruik. Beide analyses is gebaseer op die metode soos beskryf deur Heymann & Mentlein, (1981). Die reagense gebruik in die analise word weer gegee in bylaag 1.12. Tabel 3.5.1. gee 'n aanduiding van hoe elke reaksie saamgestel is.

Tabel 3.5.1: Esterase ensiem analise opstelling

Substraat	Ensiem	Inkubasie periode	Analise apparaat
Natuurlike substraat (<i>p</i> -Nitrofenielasetaat)	E.C.3.1.1.1	3 minute	U.V. (400 nm) Spektrofotometries
Adamantaankarnities-konjugaat	E.C.3.1.1.1	60 minute	ESI-MS-MS

Die reaksies is uitgevoer by pH = 7 en 'n temperatuur van 37 °C.

Die natuurlike substraat analise is uitgevoer om die ensiem, esterase (E.C.3.1.1.1), se aktiwiteit te bepaal. 'n Reaksiemengsel bestaande uit die substraat, *p*-nitrofenielasetaat (sien B.1.12), opgelos in 'n 1 ml buffer met 'n pH = 7 in 'n reaksiefles is opgemaak. Die reaksie is begin (tyd = 0) deur 2 µl ensiem by te voeg en die reaksiefles te inkubeer by 37 °C. Die substraat konsentrasie is elke 15 sekondes bepaal deur die absorbansie by 400 nm te meet met behulp van 'n Beckman DU 7500 spektrofotometer. Die finale ensiem aktiwiteit waarde word gegee in hoofstuk 4.

Die adamantaan-karnities-konjugate is opgelos in 1 ml buffer vir 'n finale konsentrasie van 1 mg/ml. Vier reaksieflesse is saamgestel vir elke konjugaat. Die reaksies is begin

(tyd = 0) deur 2 μ l ensiem by te voeg en die reaksiefles te inkubeer by 37 °C. Na 5, 30, 45 en 60 minute is die onderskeie reaksies gestop deur die reaksiefles op ys te bring en 500 μ l mieresuur by te voeg. Die reaksiemengsel is gefiltreer en gedroog onder N₂-gas. Na rekonstruksie in 'n geskikte oplosmiddel (sien B.1.11) is die massa spektrums van elke reaksie verkry om te bepaal of daar enige hidrolise van die konjugate plaasgevind het. ESI-MS-MS is gebruik om die analise uit te voer en die kondisies is dieselfde as bespreek onder 3.2.3.

HOOFSTUK 4

RESULTATE

4.1 INLEIDING

Die doel van die studie was om die potensiaal van adamantaankarnitien-konjugate vir die behandeling van pasiënte met 'n karnitientransportdefek aan te wend. Adamantaan en derivate van adamantaan is in die verlede met sukses gebruik vir die fasilitering van transport van 'n verskeidenheid molekules, insluitend proteïene. Indien die konjugate van karnitien met adamantaan wel getranspoteer kan word sal dit 'n behandelingswyse vir pasiënte met 'n defek van die karnitientransportproteïen bied. Huidiglik word die pasiënte met hoë konsentrasies karnitien behandel wat wel gedeeltelik effektief is maar nuwe effekte soos diaree en 'n onaanvaarbare visreuk maak die behandeling onaanvaarbaar.

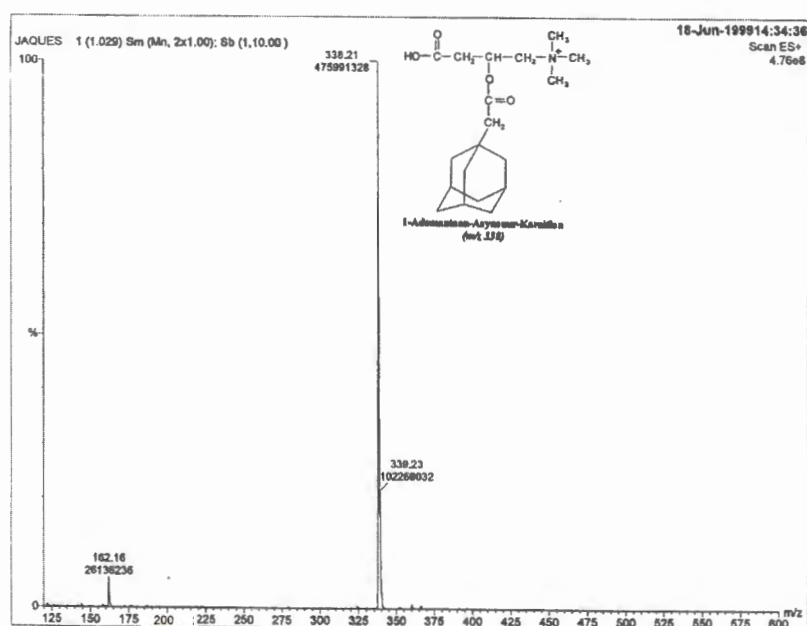
Vir die gebruik van enige medikasie is 'n aantal primêre faktore soos absorpsie, aktivering van die voorlopergeneesmiddel (prodrug), en effek van die middel op ensieme of metabolisme noodsaaklik. Gesien in die lig van die studie is dit dus eerstens belangrik om vas te stel of die beoogde adamantaankarnitien-konjugate, na orale inname, wel geabsorbeer word en uiteidelik wel in die selle in die vorm van vrye karnitien voorkom. Tweedens is dit belangrik dat die belangrikste funksie van karnitien, nl. transport van vetsure vir β -oksidasie, hierdeur gestimuleer word. Hierdie studie kan gesien word as 'n loodsstudie wat bogenoemde primêre vereistes vir die gebruik van adamantaankarnitien-konjugate as behandeling van karnitientransportdefekte sal ondersoek.

In hierdie hoofstuk word die resultate weer gegee wat bekom is tydens die onderskeie metodiese analises. Die leser se aandag word daarop gevestig dat uit die aard van die loodsstudie geen statistiese parameters bereken is nie.

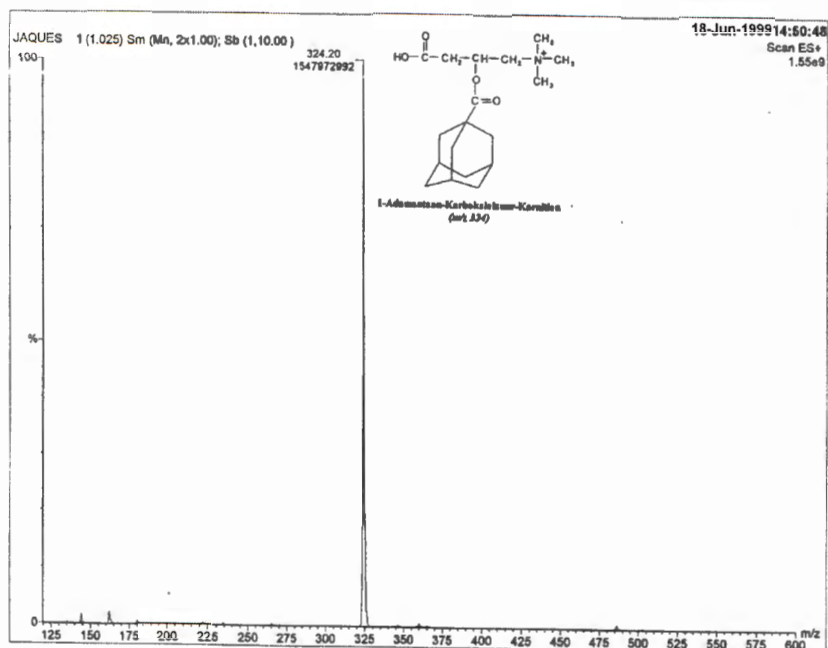
4.2 CHEMIESE SINTESE VAN DIE ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE

4.2.1 1-Adamantaankarboksiel-, 1-Adamantaanasynsuur- en 2-Amantadienkarnitien

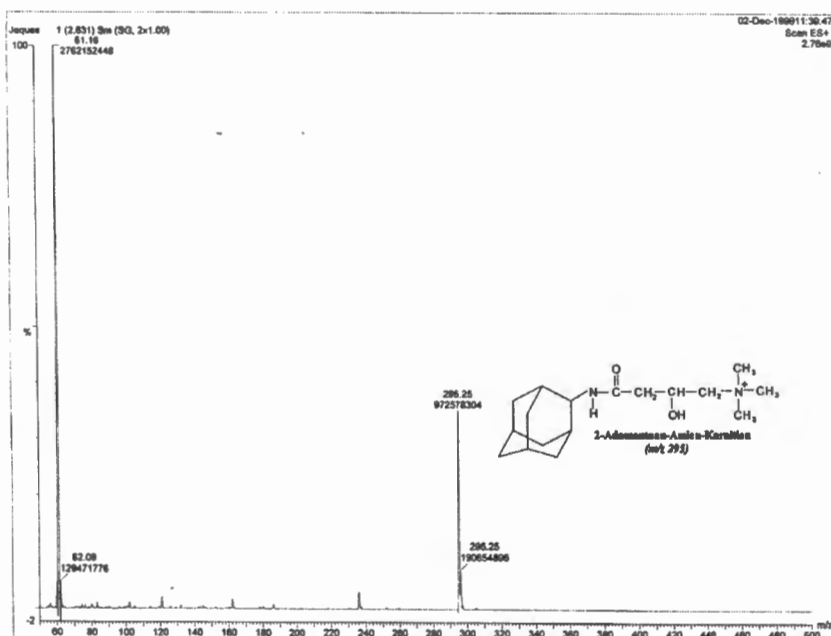
Hoewel die sintese prosedure reeds tot hoë persentasie opbrengs van die karnitienkonjugate gelei het is gepoog om die produk deur rekristallisatie te suiwer. Die rekristallisatie pogings was egter telkens onsuksesvol. Die rede hiervoor kan toegeskryf word aan die karaktereenskappe van die nuut gesintetiseerde produk. Die produk besit beide die polêre- (L-karnitien) en apolêre eienskappe (adamantaan) vanaf die oorspronklike individuele verbindinge. Volgens massaspektrometrie analises, soos gesien kan word in figuur 4.2.1, 4.2.2 en 4.2.3, was die produk minstens 95% suiwer met die voorkoms van lae konsentrasies vrye karnitien en adamantaan uitgangsstowwe. Die voorkoms van die vrye karnitien in die produk mag die resultate in die ondersoek beïnvloed. Gevolglik is dit nodig geag om 'n vrye karnitien belading ook op rotte uit te voer deur van dieselfde konsentrasie karnitien gebruik te maak wat steeds vry in die gesintetiseerde produk voorgekom het.



Figuur 4.2.1. ES-Massaspektrum van gesuiwerde 1-Adamantaanasynsuurkarnitien (m/z 338). Vrye karnitien kan waargeneem word by m/z 162.



Figuur 4.2.2. ES-Massaspektrum van gesuiwerde 1-Adamantaankarboksieelkarnitien (m/z 324).



Figuur 4.2.3. ES-Massaspektrum van gesuiwerde 2-Amantadien-karnitien (m/z 295)

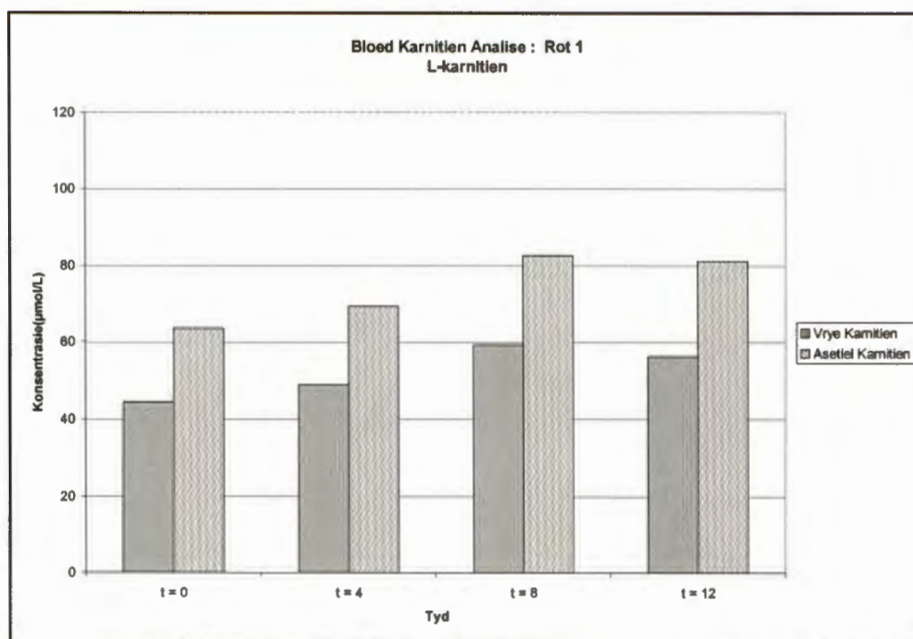
Figuur 4.2.1. tot figuur 4.2.3. toon die MS-profiel van die gesintetiseerde adamantaankarnitien-konjugate. Die eindprodukte is in die gesuiwerde vorm gebruik vir verdere *in vivo* en *in vitro* analyses wat vervolgens beskryf sal word.

4.3 BELADING IN ROTTE

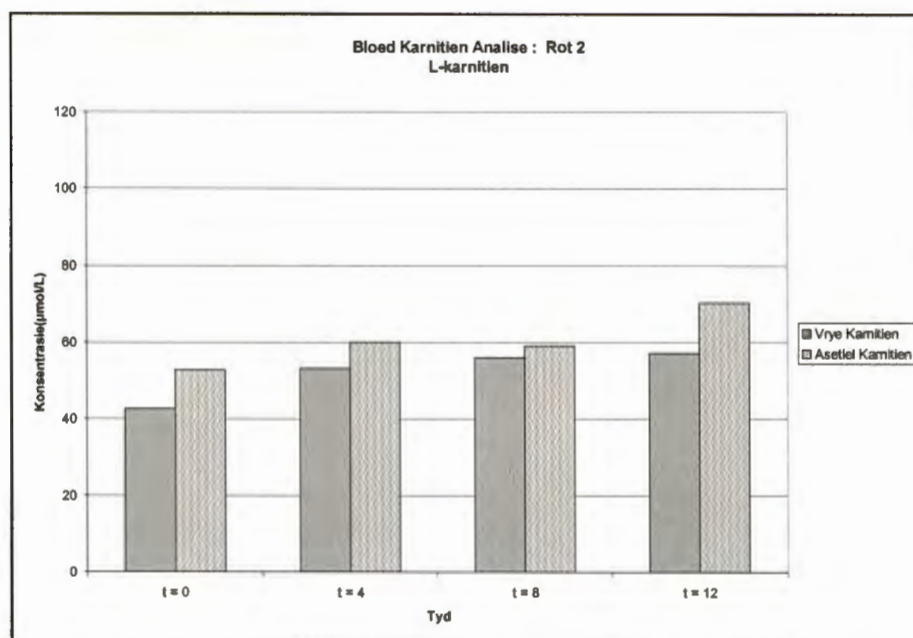
Na die belading van verskeie *Sprague Dawley*-rotte met vrye karnitien en adamantaankarnitien-konjugate is die vrye karnitienvlakke in die verskeie monsters gekwantifiseer. Die kontrole monsters (tyd = 0) word ook gegee as aanduiding van die basale waarde van elke dier. In elke geval het die proefdier as sy eie kontrole gedien. Die omgewingskondisie is konstant gehou om te verseker dat daar konsekwent gewerk word. Die volledige protokol word beskryf in Hoofstuk 3. Let wel daarop dat daar nie 'n volledige stel monsters beskikbaar is vir rot no. 8 aangesien die rot dood is enkele ure na die belading.

4.3.1 Karnitien en asetielkarnitienkonsentrasies na belading

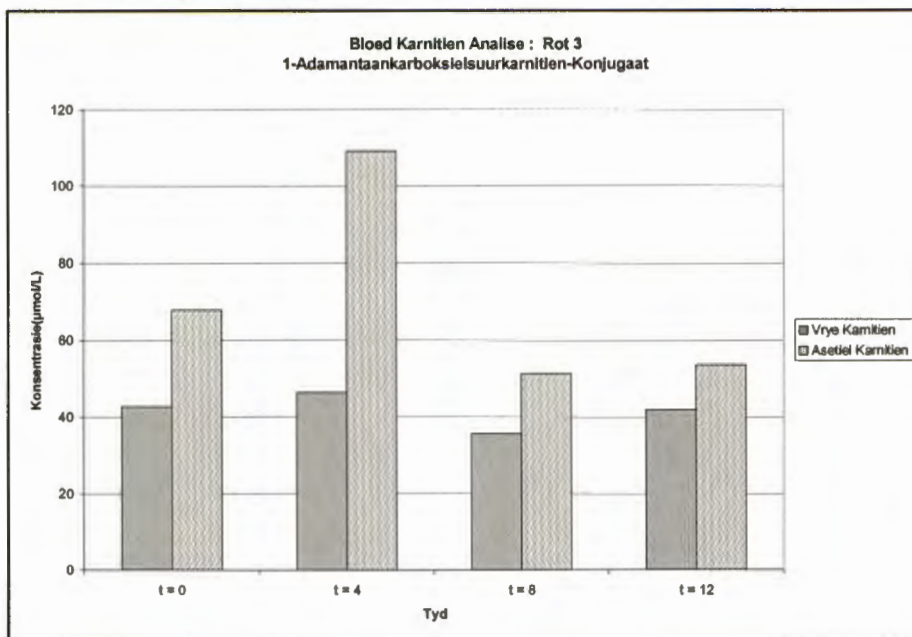
Dit was nie moontlik om met behulp van die Guthriekaart metode die teenwoordigheid van die adamantaankarnitien-konjugate te bepaal nie. Weens die chemiese eienskappe van die molekule is die verbinding nie wateroplosbaar nie en kan dus nie uit die filtreerpapier geëlueer word nie. Elueringsmetodes met behulp van organiese oplosmiddels was ook nie suksesvol nie. Die belang van die studie is egter om vas te stel of die vrye karnitienvlakke verhoog na die inname van die adamantaankarnitien-konjugate wat 'n aanduiding sal wees of die verbinding wel geabsorbeer is. In elke bloedmonster is dus vrye karnitien bepaal. Verhoogde vrye karnitien lei tot verhoogde vorming van asetielkarnitien moontlik gedeeltelik deur 'n toename aan die binding van asetiel-KoA en gedeeltelik as gevolg van die verhoging van β -oksidasie. Verhoging van asetielkarnitien kan dus gesien word as 'n positiewe respons op karnitien suplementasie. Om die rede is die asetiel-karnitienvlakke ook kwantitatief bepaal.



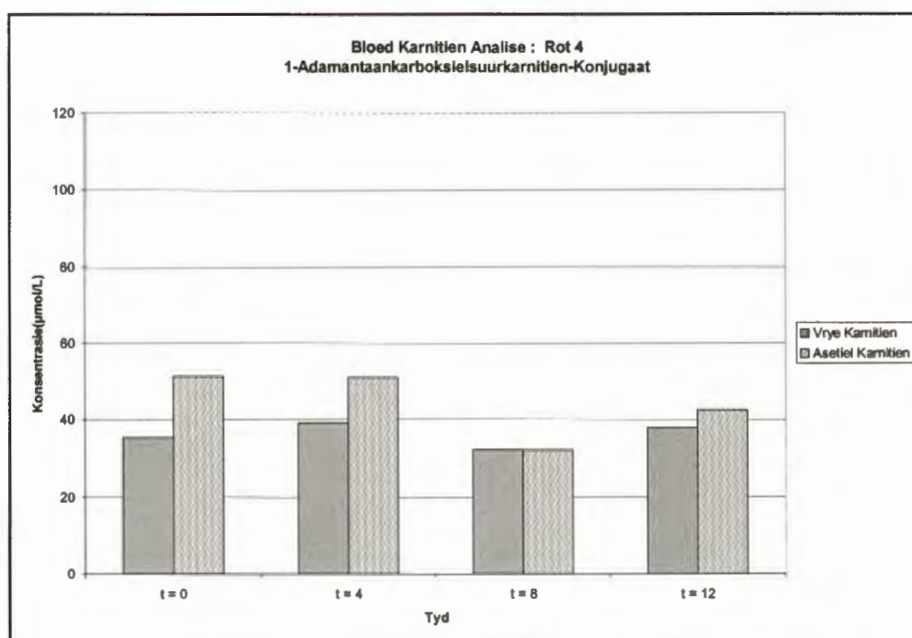
Figuur 4.3.1.a: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 1. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot L-karnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.



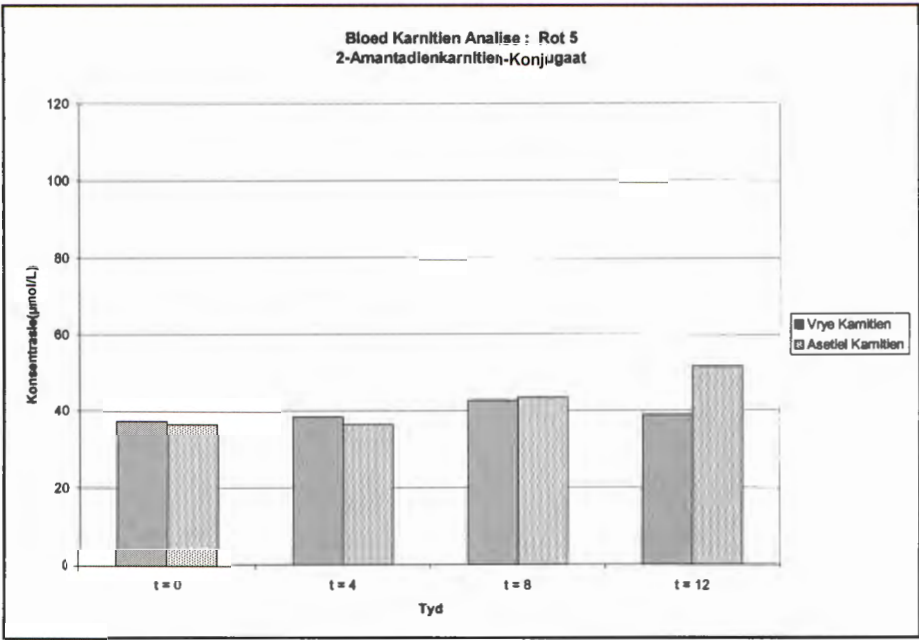
Figuur 4.3.1.b: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 2. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot L-karnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.



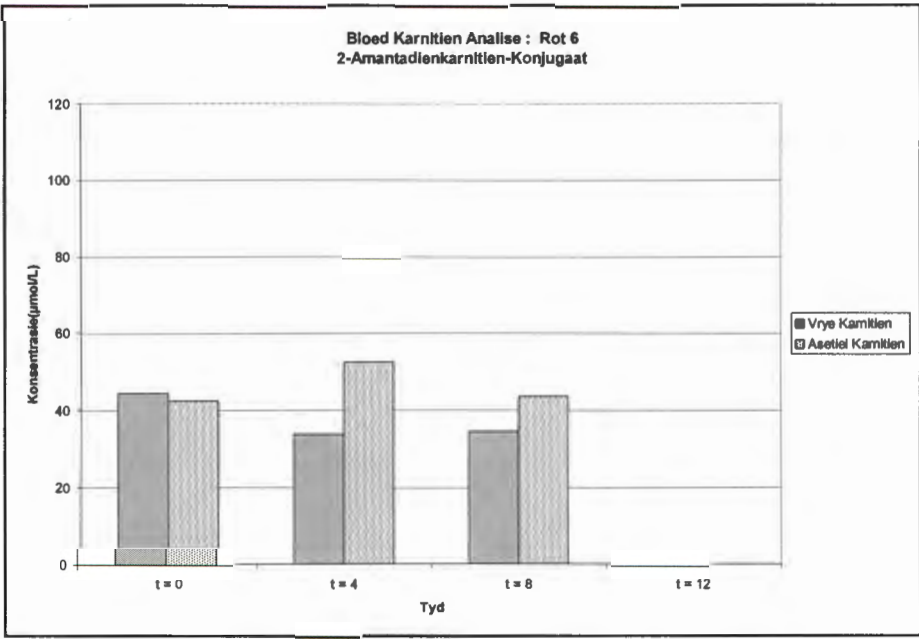
Figuur 4.3.1.c: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 3. ‘n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot adamantaankarboksielkarnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.



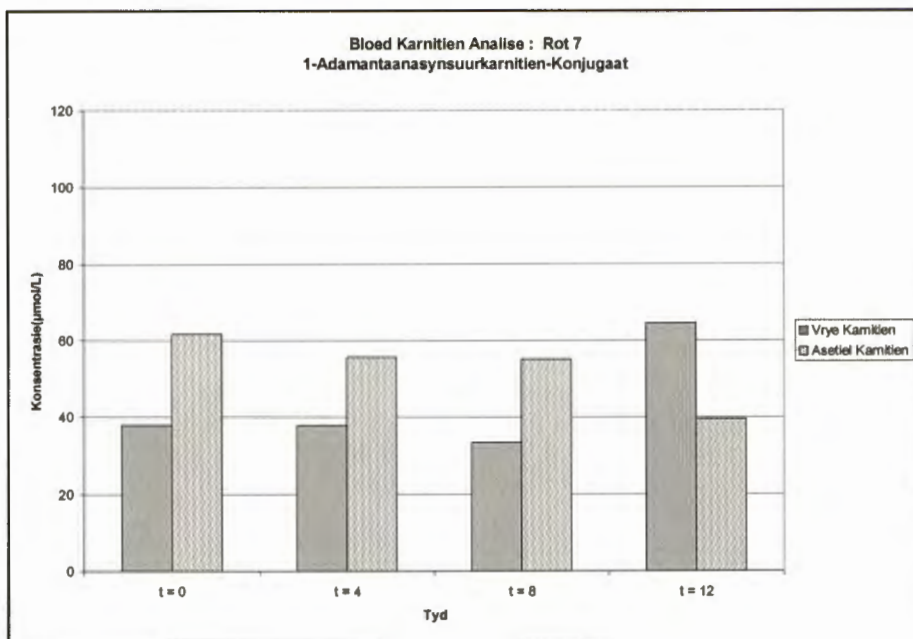
Figuur 4.3.1.d: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 4. ‘n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot adamantaankarboksielkarnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.



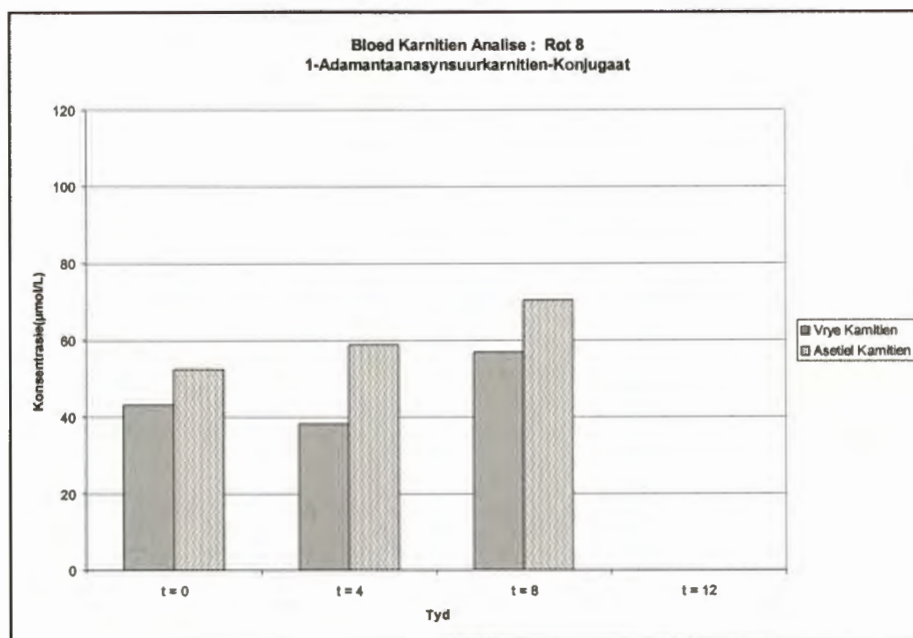
Figuur 4.3.1.e: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 5. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot amantadien-karnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.



Figuur 4.3.1.f: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 6. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot amantadien-karnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.



Figuur 4.3.1.g: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 7. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot adamantaanasynsuurkarnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.



Figuur 4.3.1.h: Karnitien en asetielkarnitien analise van rot 8. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot adamantaanasynsuurkarnitien is by tyd=0 toegedien en bloedmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetiel-karnitien konsentrasies is bepaal.

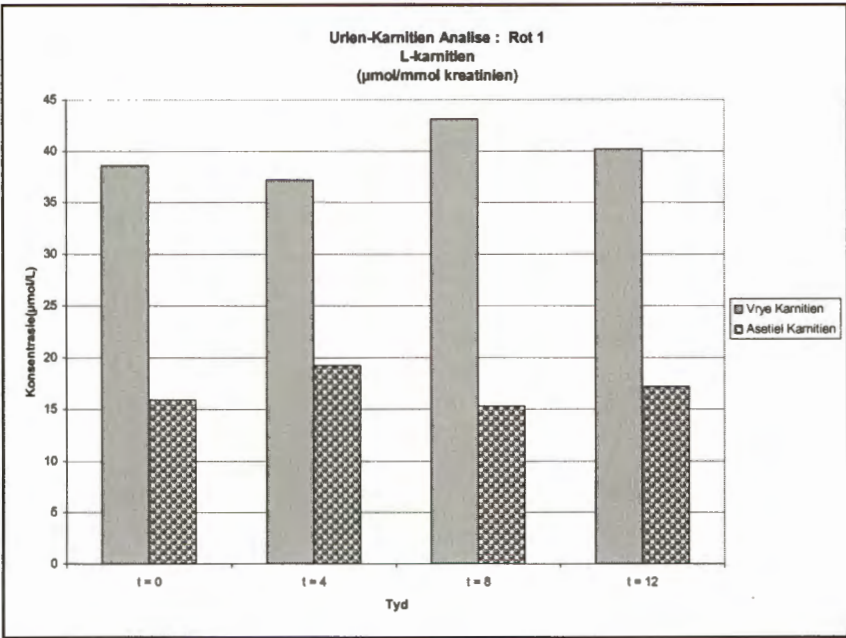
4.3.2 Urinêre karnitienanalises

4.3.2.1 Karnitienkonsentrasie relatief tot die kreatinien waardes

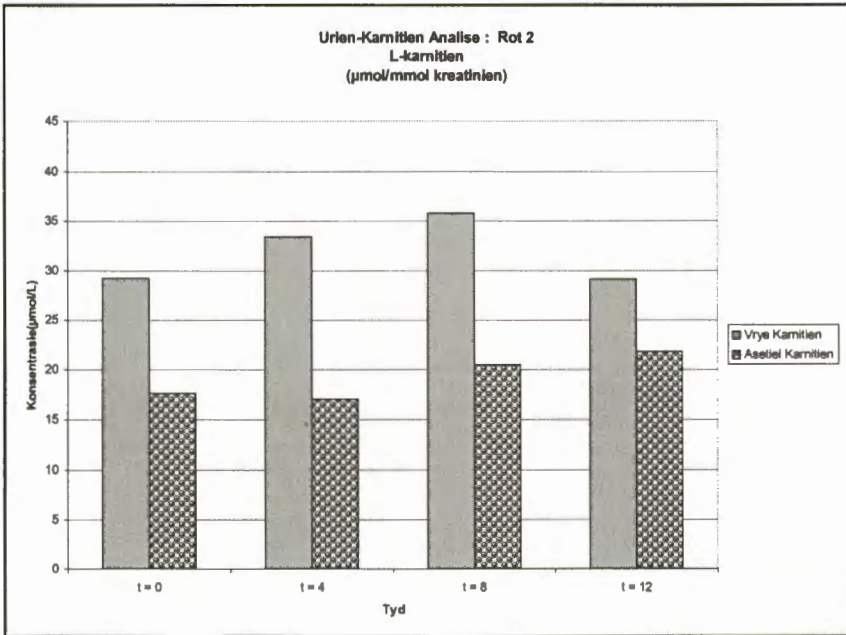
Omrede die konsentrasies van die urinêre verbindings geaffekteer word deur die hoeveelheid water wat ingeneem word is dit noodsaaklik om die kreatinienwaardes in berekening te bring vir die verkryging van vergelykbare resultate. Voor enige verdere analises uitgevoer is, is die kreatinienwaardes van die urine van die rotte bepaal volgens die metode soos beskryf in hoofstuk 3. Tabel 4.3.2.1.a. gee die individuele urienmonsters se kreatinien-waardes weer.

Tabel 4.3.2.1.a: Kreatinienwaardes soos verkry vir uriene van elke rot

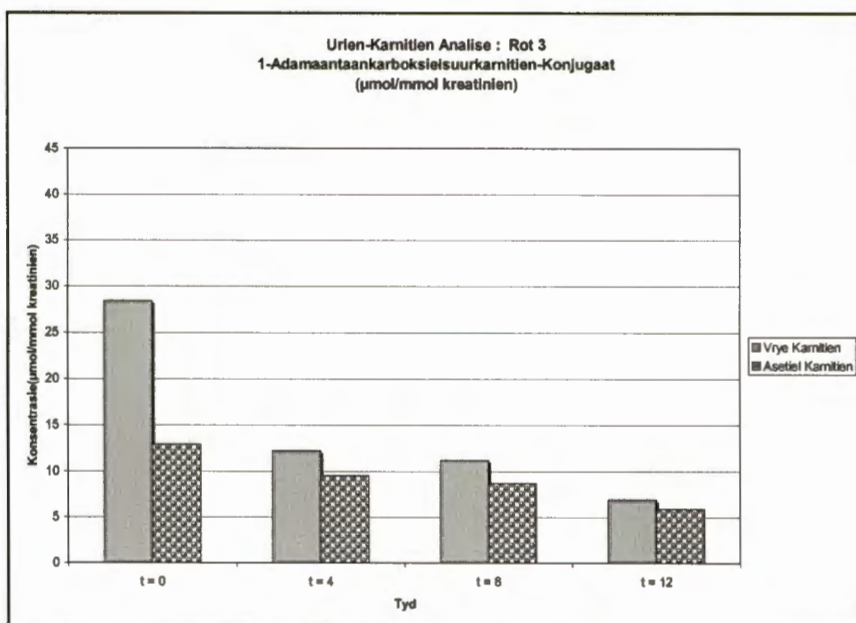
		Kreatinien waardes (mmol/L)			
		Tyd = 0	Tyd = 4	Tyd = 8	Tyd = 12
Karnitien	Rot 1	4.21	3.97	4.89	3.98
	Rot 2	3.89	4.12	2.67	4.51
1-Adamantaan-karboksielkarnitien	Rot 3	3.01	1.80	2.57	8.94
	Rot 4	1.45	2.79	8.04	7.93
2-Amantadien-karnitien	Rot 5	2.46	4.70	2.23	2.9
	Rot 6	3.24	1.56	6.48	10.28
1-Adamantaan-asynsuurkarnitien	Rot 7	6.00	5.13	6.14	6.03
	Rot 8	3.46	5.92		



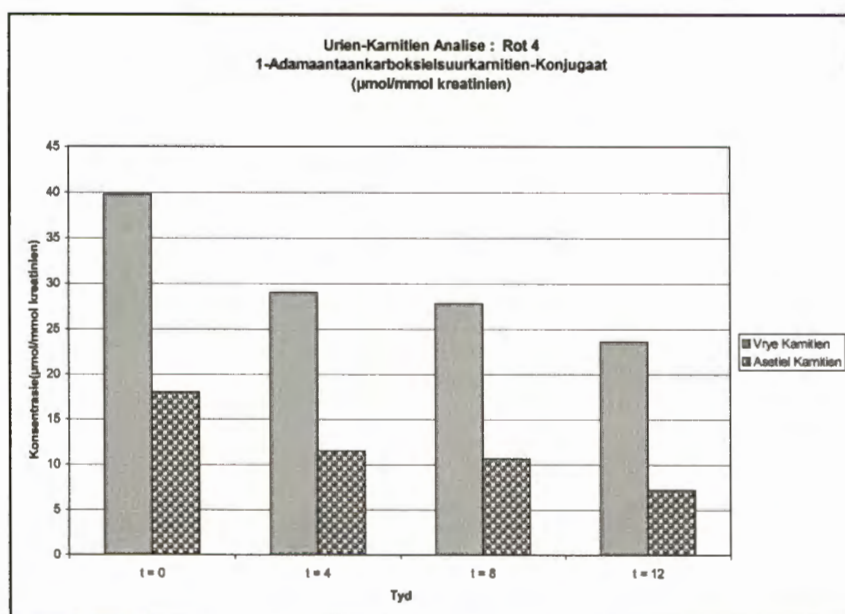
Figuur 4.3.2.1.a: Urinêre karnitienanalise van rot 1. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die L-karnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal.



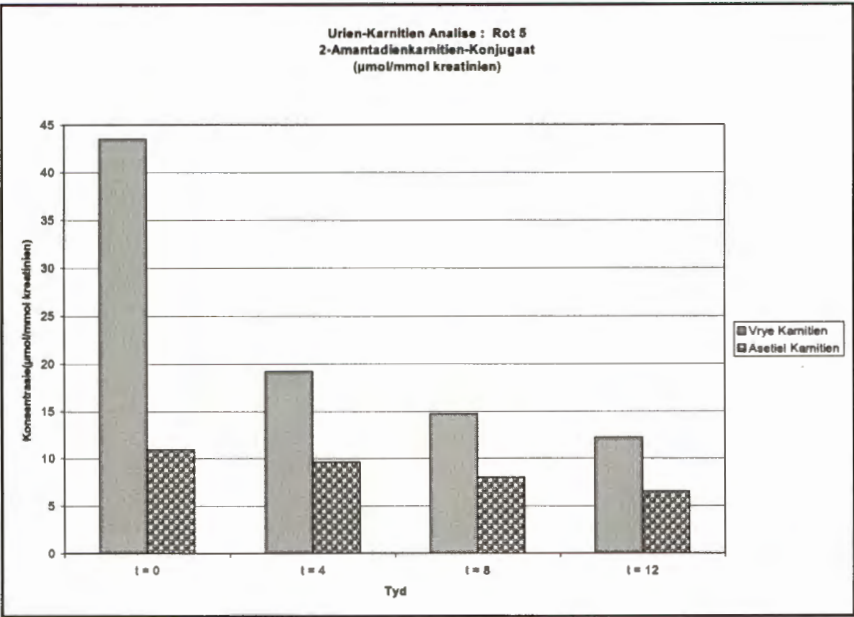
Figuur 4.3.2.1.b: Urinêre karnitienanalise van rot 2. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die L-karnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal.



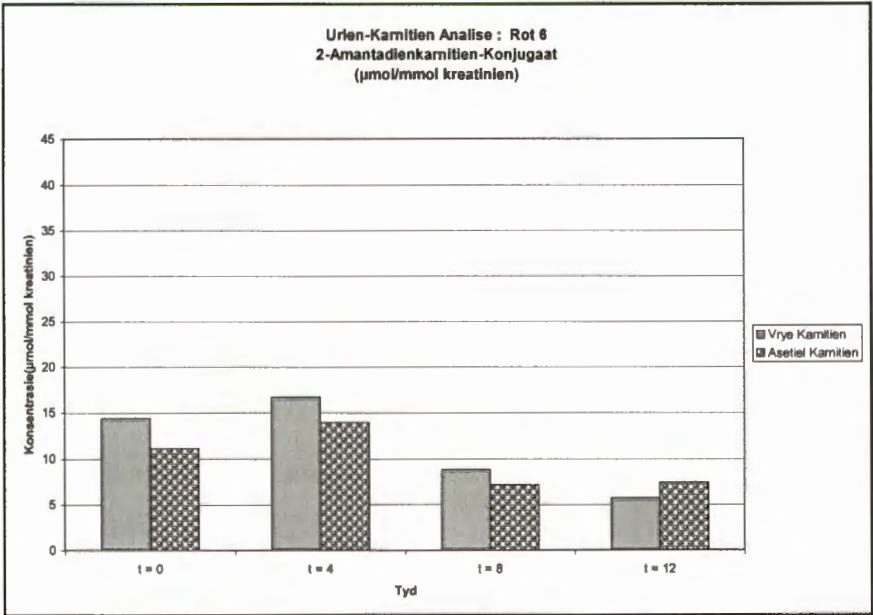
Figuur 4.3.2.1.c: Urinêre karnitienanalise van rot 3. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die adamantaankarboksielkarnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal. .



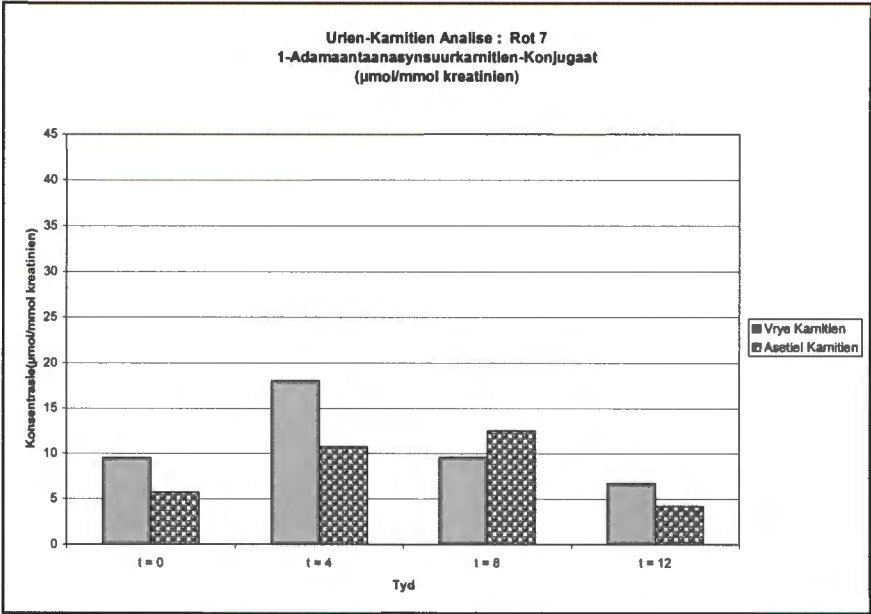
Figuur 4.3.2.1.d: Urinêre karnitienanalise van rot 4. 'n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die adamantaankarboksielkarnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal.



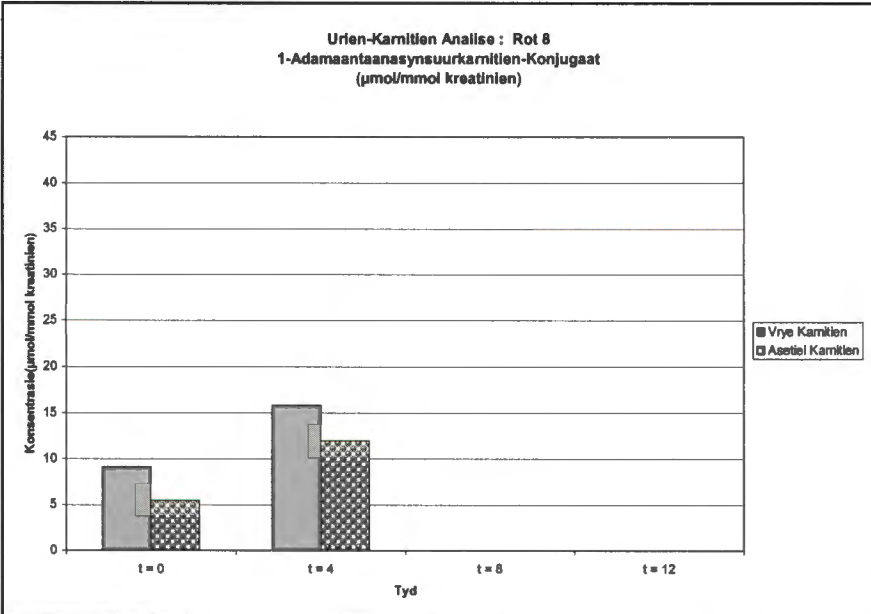
Figuur 4.3.2.1.e: Urinêre karnitienanalise van rot 5. ‘n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die amantadienkarnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal.



Figuur 4.3.2.1.f: Urinêre karnitienanalise van rot 6. ‘n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die amantadienkarnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal.



Figuur 4.3.2.1.g: Urinêre karnitienanalise van rot 7. ‘n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die adamantaanasynsuurkarnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal.



Figuur 4.3.2.1.h: Urinêre karnitienanalise van rot 8. ‘n Toediening van $\pm 1,2$ mg/rot van die adamantaanasynsuurkarnitien is by tyd=0 toegedien en urienmonsters is versamel op die aangeduide tye. Die monsters is geanaliseer en die vrye karnitien en asetielkarnitien konsentrasies relatief tot die kreatinien uitskeiding is bepaal.

4.4. BESPREEKING

Die resultate toon dat weinig en meer waarskynlik geen van die adamantaankarnitien-konjugaatkongjugate as vrye karnitien in die bloed of uriene van die rotte voorgekom het nie. Dit kan moontlik daaraan toegeskryf word dat absorpsie nie plaasgevind het nie of, indien transport wel plaasgevind het is geen van die karnitien teenwoordig in die kongjugate vrygestel nie. Met die tans beskikbare resultate wil dit voorkom of absorpsie waarskynlik nie plaasgevind het nie, in teendeel wil dit selfs voorkom of die absorpsie van karnitien geïnhibeer is deur die kongjugate. Daar het lae konsentrasies vrye karnitien in die gesintetiseerde produk teenwoordig gewees. Selfs as die konjugaat nie geabsorbeer is nie behoort die vrye karnitien wel geabsorbeer te word wat in die bloed waarneembaar behoort te wees. Die konsentrasies van die karnitien teenwoordig in die bloed het konstant gebly of 'n geringe afname getoon. Die urinêre karnitien het egter 'n duidelike afname getoon wat daarop dui dat die beskikbare vrye karnitien afgeneem het. Die afname kan daarop dui dat die kongjugate die absorpsie van karnitien in die ingewande inhibeer. Hierdie afname was veral opmerklik by die rotte wat met 1-adamantaankarboksielkarnitien behandel is, hoewel die rotte wat met adamantaanasynsuurkarnitien en 2-amantadien-karnitien behandel ook 'n matige afname getoon het. Die konsentrasies van die asetielkarnitien was goed vergelykbaar met die konsentrasies van die vrye karnitien soos verwag kan word.

Omrede dit onduidelik was of afname in vrye karnitien aan wanabsorpsie of die onvermoë om karnitien vanuit die kompleks vry te stel toegeskryf kan word, is vervolgens die vermoë van esterases om die kongjugate te hidroliseer ondersoek.

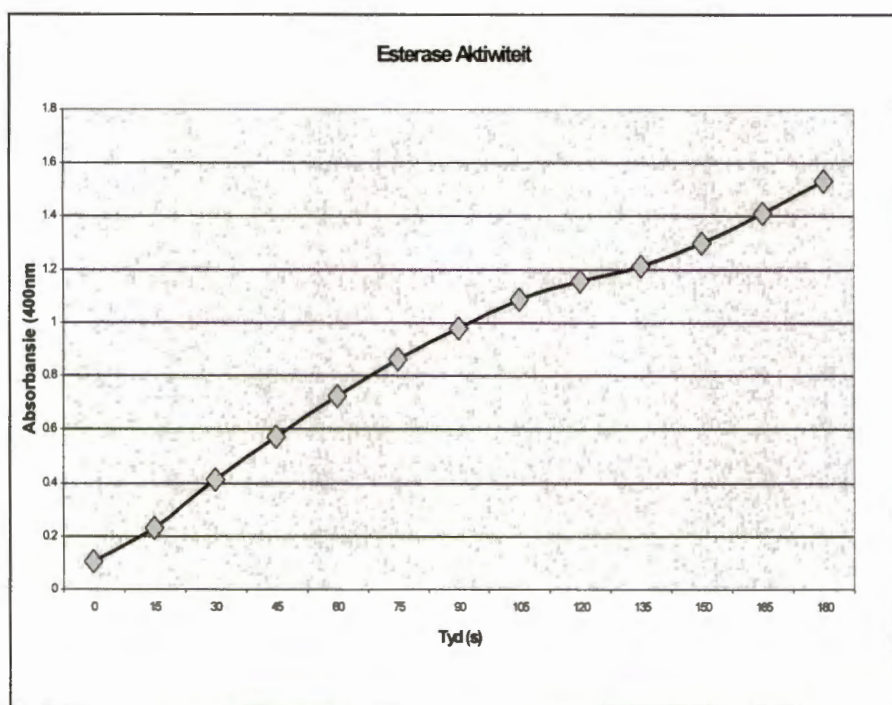
4.5. ONDERSOEK NA DIE VERMOË VAN VARKLEWER-ESTERASE OM 1-ADAMANTAANKARBOKSIELSUUR- EN 1-ADAMANTAANASYNSUURKARNITIEN TE HIDROLISEER

Esterase kom algemeen in bloed voor en is verantwoordelik vir die hidrolise van 'n groot verskeidenheid esters wat veral as voorlopergeneesmiddels (prodrugs) gebruik word. Na

alle verwagtinge behoort hierdie ensiem ook die adamantaankarnitien-konjugate te hidroliseer. Hierdie moontlikheid is ondersoek deur die adamantaankarnitien-konjugate in die teenwoordigheid van die esterase ensiem te inkubeer p-nitrofenielasetaat is gebruik as substraat in die kontrole reaksie. Die kondisies en reaksiemengsel is saamgestel soos bespreek in hoofstuk 3.

4.5.1 Ondersoek na die moontlikheid dat varklewer-esterase die adamantaankarnitien-konjugate kan hidroliseer

Die geruk van p-nitrofenielasetaat as substraat vir die esterase ensiem het op die verwagte aktiwiteit van die ensiem getoon soos weergegee word in figuur 4.5.1.



Figuur 4.5.1. Ensiemaktiwiteit soos bepaal met p-nitrofenielasetaat as substraat.

Die grafiek toon die gehidroliseerde p-nitrofenielasetaat oor 'n tydperk van drie minute gemeet by 400 nm met behulp van 'n fotometer. Uit die grafiek is die ensiem-aktiwiteit bepaal as 0,5316 eenhede/min. Gegewe die resultate is die resultate ondersteunend van 'n aktiewe ensiem.

Die onderskeie gesintetiseerde konjugate is ook blootgestel aan esterase hidrolise en die reaksie opstelling is geoptimaliseer as verteenwoordigend van fisiologiese kondisies. Die

reaksie is gevolg deur middel van massaspektrometrie analyses van die oorblywende substraat na afloop van die reaksie. Die resultate is nie gekwantifiseer nie maar word weergegee as oppervlakeenhede van die verkrygte piek na die analyses. Tabel 4.5.1 toon die twee konjugaat se oppervlakteresponse aan vir die individuele reaksies.

Tabel 4.5.1: Oorblywende konjugaat na ensiem hidrolise

Tyd (minute)	0	5	30	60
Oppervlakte (1-Adamantaankarboksielkarnitien)	46755840	47079424	44347392	46034944
Oppervlakte (1-Adamantaanasynsuurkarnitien)	47132672	43937792	47325184	36204544

2-Amantadien-karnitien is nie onderwerp aan die hidrolise nie omrede die binding in die geval van die konjugaat 'n peptiedbinding is.

4.5.2. Bespreking

Die resultate soos verkry in tabel 4.5.1 toon duidelik dat geen of baie min hidrolise deur middel van varklewer-esterase van die adamantaankarnitien-konjugate verkry is. Die moontlikheid dat absorpsie dus wel plaasgevind het maar hidrolise van die konjugate nie kon plaasvind nie is dus nie uitgesluit nie. Hierdie moontlikheid verklaar egter nie die afname wat waargeneem is in die konsentrasies van vrye karnitien nie. Dit is steeds moontlik dat die adamantaankarnitien-konjugate wel oor die selmembrane getranspoteer sal kan word en dat karnitienasieltransferase wel van die karnitien gebruik sal kan maak. Orale toediening van die produk lyk op die stadium nie 'n moontlike opsie nie, maar die produk mag moontlik selfs intraveneus aangewend word. Vir die doel om die moontlikheid te ondersoek is fibroblaste van 'n normale persoon en 'n persoon met 'n bekende defek van die karnitientransportproteïen verkry.

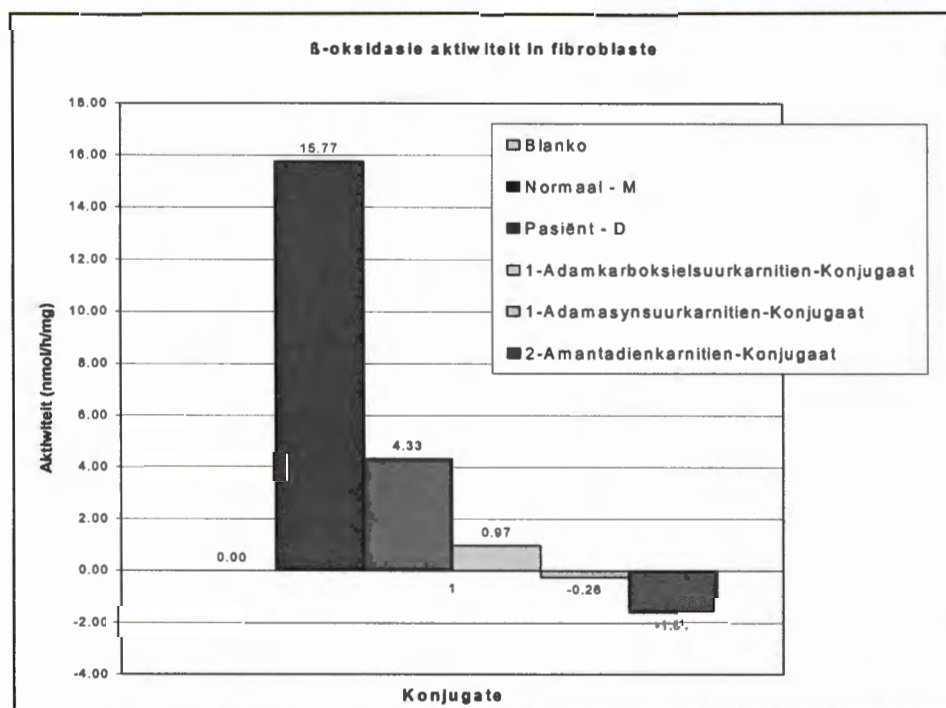
4.6. TRANSPORTSTUDIE VAN ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE IN FIBROBLASTSELKULTURE

4.6.1. Inleiding

Fibroblaste is verkry van 'n normale persoon (M) en 'n pasiënt met 'n bekende defek van die karnitientransportproteïen (D). Die selkulture is behandel met die adamantaankarnitien-konjugate soos beskryf in hoofstuk 3 en die intrasellulêre karnitienkonsentrasies en β -oksidasie van radioaktiefgemarkte vetsure is bepaal. soos beskryf.

4.6.2 β -oksidasie aktiwiteit voor en na behandeling van selle met adamantaankarnitien-konjugate

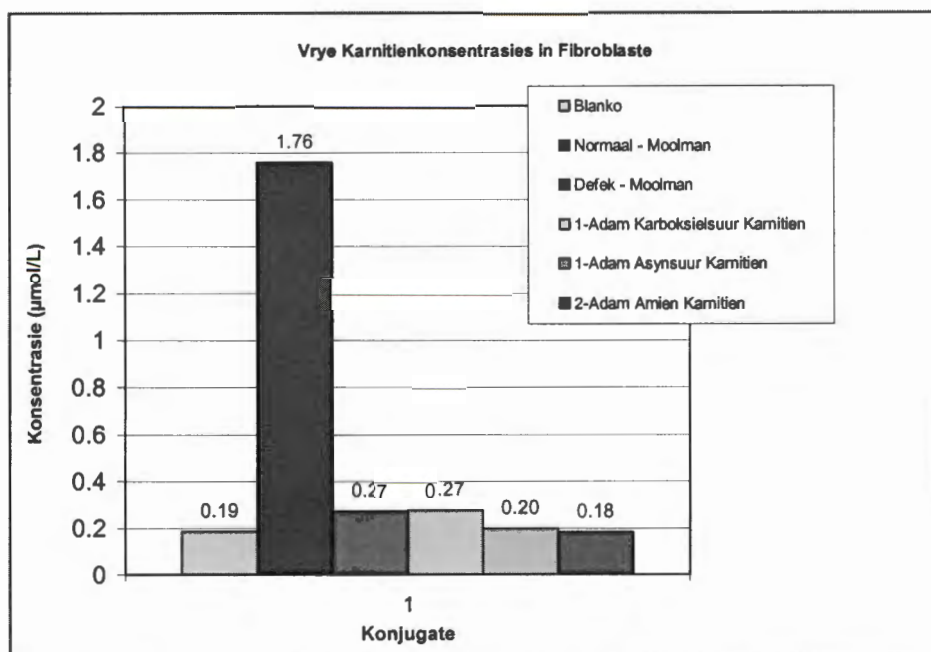
Die β -oksidasie aktiwiteit is bereken en word weer gegee in figuur 4.6.2.a. Die aktiwiteit word weer gegee in nmol/h/mg.



Figuur 4.6.2.a: β -oksidasie aktiwiteit soos bepaal m.b.v. palmitiensuuroksidasie.

4.6.3 Vrye L-karnitien teenwoordig voor en na behandeling van selle met adamantaankarnitien-konjugate.

Die selle is geïnkubeer in die teenwoordigheid van adamantaankarnitien-konjugate en intrasellulêre vrye karnitienkonsentrasies is kwantitatief bepaal. Die volgende resultate is verkry (Fig. 4.6.3.a.).



Figuur 4.6.3.a: Vrye karnitienkonsentrasie in fibroblaste.

4.6.4 Bespreking

Weereens het die resultate wat verkry is aangetoon dat die transport van karnitien, in die geval ook oor die selmembraan, deur adamantaankarnitien-konjugate geïnhibeer word. Hierdie inhibisie het nie slegs die transport van karnitien nadelig geraak nie, maar die totale β -oksidasie tot stilstand gebring. Ten spyte van die positiewe resultate wat verkry is deur die gebruik van adamantaankonjugate om transport te fasiliteer kan met reg beweer word dat adamantaankarnitien-konjugate nie vir die transport van karnitien aangewend kan word nie. In teendeel dit wil voorkom of die middel eerder as 'n model vir karnitientransportdefekte aangewend kan word.

HOOFSTUK 5

BESPREKING EN GEVOLGTREKKING

5.1 INLEIDING

In hierdie verhandeling is die moontlikheid ondersoek of die trisikliese hokverbinding, adamantaan en derivate van adamantaan, as transport fasiliteerders vir karnities aangewend kan word. As toepassing sou sodanige verbinding vir die behandeling van pasiënte met 'n aangebore defek van die karnitiestransportproteïen gebruik kon word. Adamantaan en derivate van adamantaan is in die verlede reeds met sukses vir die transport van 'n verskeidenheid molekules aangewend. Vir die doel van die studie is drie adamantaankarnities-konjugate nl, 1-adamantaankarboksielkarnities, 1-adamantaanasynsuurkarnities en 2-amantadien-karnities gesintetiseer en is die drie konjugate aan toetse onderwerp om die absorpsie, vrystelling en effek van die verbinding op β -oksidasie van vetsure te bepaal.

5.2 CHEMIESE SINTESE: ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE

Die suksesvolle sintese van die adamantaan-karnitieskonjugate was van kardinale belang gewees vir die vordering van die projek. Dit is bereik en soos getoon in afdeling 4.2 is 'n baie suiwer produk verkry. Rekristallasie van die produk was nie suksesvol nie, maar gesien in die lig van die hoë mate van suiwerheid wat verkry is, is dit nie nodig geag om meer tyd daaraan te spandeer nie. So ver bekend is die konjugate van adamantaan nog nooit voorheen gesintetiseer nie. Die sintese is veral bemoeilik deur die geweldig groot verskil in polariteit van die twee uitgangsstowwe.

5.3 ABSORPSIE EN VRYSTELLING VAN ADAMANTAANKARNITIEN-KONJUGATE

Vir die doel om die absorpsie van die adamantaankarnitien-konjugate te bepaal is 'n belading op rotte uitgevoer en die vrye karnitien is in die bloed en uriene oor 'n tydperk van 12 uur bepaal. Die prosedure het aangetoon dat geen absorpsie plaasgevind het nie of indien absorpsie wel plaasgevind het, is die karnitien nie vrygestel vanaf die konjugaat nie. Hoewel daar lae konsentrasies vrye karnitien in die produk teenwoordig was, het die vrye karnitien in die bloed maar veral in die uriene drasties afgeneem. Hierdie afname was veral uitgesproke vir adamantaankarboksielsuurkarnitien. Verder ondersoek het aangetoon dat varklewer-esterase nie die adamantaankarnitien-konjugate as 'n substraat kan gebruik nie. Ons kan dus nie met sekerheid verklaar dat absorpsie nie plaasgevind het nie, maar die afname van die vrye karnitien, ten spyte van die teenwoordigheid van karnitien in die preparaat, kan op geen ander wyse verklaar word nie.

Die afname van vrye karnitien het gepaard gegee met 'n afname in asetielkarnitien. Die hoofbron van asetielkarnitien is waarskynlik asetiel-KoA wat deur asetiel-KoA-karnitientransferase gevorm word. 'n Afname in vrye karnitien sal dus noodwendig gepaard gaan met 'n afname in die produksie van asetielkarnitien. 'n Verlagings van β -oksidasie mag ook in 'n mindere mate 'n bydrae lewer aangesien die transport van vetsure noodsaaklik is vir β -oksidasie. 

Volgens Antoniadou-Vyza *et al.*, (1996) en Tsuzuki *et al.*, (1994) verhoog die koppeling van 'n adamantaan molekule aan 'n verbinding van belang, die lipofilisiteit van die verbinding. Die vatbaarheid vir ensimatiese hidrolise berus egter op die koolstof kettinglengte tussen die adamantaan verbinding en die gekonjugeerde verbinding.  Hierdie waarneming word ook in die resultate van die studie weerspieël aangesien die afname in vrye karnitien na die belading met 1-adamantaanasetielkarnitien minder was as in die geval van 1-adamantaan karboksielkarnitien.

5.4 TRANSPORT EN EFFEK VAN KARNITIEN-ADAMANTAAN-KONJUGATE IN EN OP FIBROBLASTSELKULTURE

Soos in die geval van die absorpsie toon die resultate verkry in die studie aan dat geen transport oor die selmenbraan plaasgevind het nie en dat die transport van karnitien waarskynlik geïnhibeer is. Die verlaagde transport het in die geval van pasiënt D bygedra tot verdere verlaging van β -oksidasie, soos verwag kan word. Volgens Antoniadou-Vyza *et al.*, (1996) veroorsaak adamantaanderivate 'n versteuring in mikrobiese selwande se deurlaatbaarheid wat lei tot die uitlek van intrasellulêre verbindings. In hierdie studie is hierdie moontlikheid nie ondersoek nie en kan dit dus nie uitgesluit word nie. 'n Beskadiging van die selmenbraan kan potensieel tot 'n verlaging van intrasellulêre karnitienkonsentrasies lei. Dit sal egter nie noodwendig tot 'n verlaging van die β -oksidasie van vetsure lei nie en om die rede word aangevoer dat die adamantaankarnitien-konjugate wat in die studie gebruik is waarskynlik tot inhibisie van karnitientransport bygedra het.

Hoewel die meganisme van die moontlike inhibisie nie ondersoek is nie en dit ook nie die doel van die studie was nie, is dit moontlik om daaroor te spekuleer. Indien die adamantaankarnitien-konjugaat steeds aan die bindingsdomein van die karnitientransportproteïene bind kan die teenwoordigheid van die hoogs apolêre adamantaan gedeelte van die molekule moontlik transport voorkom en kan inhibisie verkry word. Indien hierdie hipotese geldig is kan dit moontlik algemeen geld in die toepassings van adamantaan as transportfasiliteerder wat daarop sal neer kom dat adamantaan moontlik nie gebruik kan word vir die transport van verbindings waarvoor daar 'n spesifieke transportproteïen op die selmenbraan voorkom nie.

Die moontlikheid dat die konjugate toksisiteit vertoon is nie ondersoek nie, maar kan nie uitgesluit word nie. Een van die rotte is tydens die studie dood na 'n belading. Die ander

rotte wat in die studie gebruik is het egter geen negatiewe simptome vertoon nie en kan die dood van die enkele rot moontlik aan ander oorsake toegeskryf word.

5.5 SAMEVATTING

Die keuse van die adamantaanderivaat as geskikte draer berus geheel en al by die feit dat adamantaan se karakteristieke eienskappe dit uitersgeskik maak vir 'n draermolekuul. Dit is baie lipofilies en ook baie stabiel. Karnitien aan die anderkant is 'n lewensnoodsaaklike verbinding wat die konjugering van die twee verbindings uiters voordeling kan maak. Dit maak die suksesvolle sintese van die drie adamantaankarnitien-konjugate per sy 'n baie belangrike deurbraak.

Die vraag wat as doelwit vir die studie daar gestel is nl. kan 'n adamantaankarnitien-konjugaat gebruik word om karnitien oor membrane te transporteer is duidelik beantwoord. Hierdie molekule vertoon geen potensiaal om as behandelingsmetode vir pasiënte met metaboliese defekte gebruik te word nie, in teen deel dit het waarskynlik 'n potensiaal om die effek van karnitientransport defekte te ondersoek en kan moontlik in die toekoms as 'n model gebruik word.

BYLAAG 1

B.1.1 CHEMIESE SINTESE

1-Adamantaan-Asynsuur	Sigma Aldrich	(MM: 194,27)
1-Adamantan-Karboksielsuur	Fluka	(MM: 180,25)
2-Adamantaan-Amien	Sigma Aldrich	(MM: 151,25)
L-Karnitien	Roche Chemicals	(MM: 161,20)
1-Hidroksi-Benzotriazool (HoBt)	Fluka	(MM: 135,13)
Disikloheksielkarbodiimied (DCC)	Fluka	(MM: 206,33)
Dietielformamied (DEF)	Sigma Aldrich	(MM: 101,15)
Tionielchloried (SOCl_2)	Sigma Aldrich	(MM: 118,97)
Chloroform	SMM Instruments	(MM: 153,82)
Trichloorasynsuur (TCA)	Merck	(MM: 163,39)
Kaliumchloried (KCl)	Saarchem	(MM: 74,56)

B.1.2 STERIELE 10 X PBS-OPLOSSING.

NaCl (Mw = 58.44)	Merck	80 g
KCl (Mw = 74.56)	Saarchem-Holpro Analytic (Pty) Ltd	2 g
Na_2HPO_4 (Mw = 177.99)	Merck	9,2 g
KH_2PO_4 (Mw = 136.09)	BDH Chemicals Ltd.	2 g
MgCl_2 (Mw = 203.30)	Saarchem-Holpro Analytic (Pty) Ltd	1 g

Los die reagentse op in dubbel gedistilleerde water (H_2O dd) en maak op tot 1 l met H_2O dd. Moenie die 10 x PBS oplossing outoklaveer nie. Stoor by 4 °C. Neem 20 ml van die 10 x PBS oplossing en verdun tot 200 ml met H_2O dd vir 'n 1 x PBS oplossing. Outoklaveer die 1 x PBS oplossing en toets vir steriliteit. Stoor by 4 °C.

B.1.3 STERIELE MEDIUM

Vir 80 ml medium met antibiotika:

Ham se F10 Voedingsmedium met 15 mM HEPES	Gibco	70,4 ml
Fetale kalfserum	Sterilab	8,0 ml
Pen-Strep (antibiotika)	Gibco	0,8 ml

Die medium bevat 10% serum. Indien dit nie nodig is dat die selle vinnig groei nie of as flesse naby volgroeï is, kan die hoeveelheid serum verminder word. Die medium is vir steriliteit getoets voordat dit by 4 °C in die donker gestoor is.

Vir medium sonder antibiotika is dieselfde metode gebruik. Die hoeveelheid Pen-Strep word net deur Ham se F10 voedingsmedium vervang

B.1.4 STERIELE 0.1% EDTA

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	0.1 g
SIGMA Kat. no E-5134 (MW = 372.2)	
H ₂ O dd	100 ml

Stel eers die pH van die oplossing in tot 8,0 deur gebruik te maak van 1 M NaOH. Die pH is ingestel om te verseker dat die EDTA oplos. Vul daarna die volume op tot 100 ml. Outoklaveer die oplossing en toets vir steriliteit. Stoor by 4 °C.

B.1.5 STERIELE TRIPSIEN/ 0.1% EDTA- MENGSEL

Vir 'n 20 ml oplossing:

Tripsien (0.25 %)	Highveld Biologicals	8 ml
0.1% EDTA (oplossing B.1.3)		12 ml

Toets die oplossing se steriliteit. Stoor by 4 °C in die donker.

B.1.6 PROTEÏENBEPALINGSREAGENS

Bicinchoninic acid solution (SIGMA, Kat. no. B-9643)

Sigma copper (II) sulfate (SIGMA, Kat. no. C-2284)

Meng die Bicinchoniniensuur-oplossing en die Koper(II)sulfaat-oplossing in die verhouding van 50:1.

Vir 'n 2 ml oplossing:

Bicinchoniniensuur	1960 ml
Koper(II)sulfaat	40 ml

Meng die twee reagense goed. Die mengsel is liggroen van kleur.

B.1.7 β -OKSIDASIE SUBSTRAAT

Vir 'n 400 μ l inkubasievolume per reaksie:

Warm substraat (1:20 verdunning)

[9,10- ³ H]-palmitiensuur (Amersham, Kat. no. TRK 909)	1 μ l
Etanol (98%)	19 μ l

Koue substraat

Palmitiensuur (2mM vrye suur)	2 g
Etanol (98%)	100 μ l
BSA (2%) (Boehringer Mannheim Kat. no. 775827)	40mg

Los afgeweege vetsuur op in etanol. Los 40 mg BSA (Albumin Fraction V, Vetsuurvry) op in 2 ml H₂O dd. Los nou 2 mM vetsuur in 2 % vetsuur vrye BSA op.

RPMI 1640-medium met 20 mM HEPES (Sonder glukose/glutamien) (Gibco)

Die inkubasievolume van 400 µl vir elke reaksie het bestaan uit 4,6 µl warm substraat, 20 µl koue substraat en 375,4 µl RPMI-medium. Die samestelling verteenwoordig konsentrasie aktiwiteit van 400 000 dpm's.

B.1.8 IOONUITRUILINGS HARS

Vir die ionenuitruilings behandeling van die individuele reaksies:

Dowex-1 X8 (SIGMA-ALDRICH)	10 ml
NaOH (1M)	90 ml

B.1.9 SINTILLASIE TELVLOEISTOF

Ultima Gold XR (Kat nr. 6013119) Analytical Diagnostic Products	5 ml
---	------

B.1.10 INTERNE STANDAARD

Die interne standaard gebruik vir beide die urien- en bloedmonster analyses het bestaan uit 'n oplossing van stabiele isotope van bekende konsentrasies. Die isotope is verskaf deur:

Metabolic Laboratory
Academic Hospital
Amsterdam

[metiel-D ₃]-L-karnitien.HCl	(m/z 221)	25 mg
[metiel-D ₃]-asetiel-L-karnitien.HCl	(m/z 263)	25 mg

Die interne standaard oplossing bestaan uit 100 µl karnitien isotoop en 400 µl aminosuur isotoop oplossing. Die finale konsentrasie van die vrye karnitien isotoop (213* massa eenhede) in die interne standaard is 6,098 µmol/ml.

B.1.11 ES-MS-MS KONJUGAATOPLOSMIDDEL

Asetonitriël	(BDH, "Far UV" HPLC-Grade)	50 ml
Mieresuur	(BDH)	1 ml
H ₂ O dd		50 ml

Meng bg. reagentse saam in die verhouding (50:50:1) om geskikte oplosmiddel te gebruik.

B.1.12 VARKLEWER ESTERASE ENSIEM ANALISE

Die volgende reagentse is gebruik:

Esterase (E.C.3.1.1.1)	(Sigma-Aldrich, Kat. Nr. E-2884)	2 µl
(5,714 ensiem eenhede (U)		
ρ-Nitrofenielasetaat	(Sigma-Aldrich, Kat. Nr. N-8130)	0,0235 g
Natrium-asetaat buffer (0,1 M)	(Saarchem)	1 ml
Mieresuur	(BDH)	0,5 ml

HOOFSTUK 6

LITERATUUR VERWYSINGS

ANGELINI, C., VERGANI, L., COSTA, L., MARTINUZZI, A., DUNNER, E., MARESCOTTI, C., NOSADINI, R. 1986. Use of carnitine in exercise physiology. Advance Clinical Enzymology, 4:103-110.

ANGELINI, C., MARTINUZZI, A., VERGANI, L. 1991. Treatment with L-carnitine of the infantile and adult form of primary carnitine deficiency. (*In*: Ferrar, R., DiMaurro, S., Sherwood, G. *eds*. L-carnitine and it's role in medicine: from function to therapy. New York: Academic Press. p.139-153.

ANGELINI, C., VERGANI, L., MARTINUZZI, A. 1992. Clinical and biochemical aspects of carnitine deficiency and insufficiency: Transport defects and inborn errors of β -oxidation. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 29(3.4):217-242.

ANTONIADOU-VYZA, E., TSITSA, P., HYTIROGLOU, E., TSANTILIKAKOULIDOU, A. 1996. New adamantan-2-ol and adamantan-1-methanol derivatives as potent antibacterials. Synthesis, antibacterial activity and lipophilicity studies. European Journal of Medicinal Chemistry, 31:105-110.

AOKI, F.Y., SITAR, D.S. 1985. Amantadine kinetics in healthy elderly mem: implications for influenza prevention. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 37:137-144.

AOKI, F.Y., SITAR, D.S. 1988. Clinical pharmacokinetics of amantadine hydrochloride. Clinical Pharmacokinetics, 14:35-51.

BAHL, J.J., BRESSLER, R. 1987. The pharmacology of carnitine. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 27:257-277.

BERGSTROM, D.E., ABRAHAMSON, J.K., CHAN, M.Y. 1991. Nucleoside and nucleotide transport through a model liquid membrane. Periodic-catastrophic transport of a novel amantadine phosphoramidate conjugate of 5'-AMP. Biochimica et Biophysica Acta, 1061:95-105.

BIEBER, L.L., VALKNER, K., FARRELL, S., 1982. Carnitine acyltransferases of liver peroxisomes. Annals of the New York Academy of Science, 386:395-396.

BIEBER, L.L. 1988. Carnitine. Annual Review of Biochemistry, 57:261-283.

BLAU, N., DURAN, M., BLASKOVICS, M.E. 1996. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. London : Chapman & Hall. p.259-276.

BOHMER, T ., MOLSTAD, P. 1980. Carnitine transport across the plasma membrane. (*In*: Frenkel, R.A., McGarry, J.D., eds. Carnitine Biosynthesis, Metabolism and Functions. New York: Academic Press. p.73-89.

BORUM, P.R. 1986. Clinical aspects of human carnitine deficiency. New York, N.Y.:Pergamon Press. p.1-132 and 204-242.

BRASS, E.P. 1992. Carnitine transport. (*In*: Ferrar, R., DiMaurro, S., Sherwood, G. eds. L-carnitine and it's role in medicine: from function to therapy) New York: Academic Press. p.21-36.

BREMER, J. 1983. Carnitine - metabolism and functions. Physiological Reviews, 63:1420-1480.

BREMET, J. 1961. Biosynthesis of carnitine in vivo. Biochimica et Biophysica Acta, 48:622-624.

BREVETTI, G., CHIARIELLO, M., FERULANO, G., POLICICCHIO, A., NEVOLA,

E., ROSSINI, A., ATTISANO, T., AMBROSIO, G., SILIPRANDI, N., ANGELINI, C., 1988. Increase in walking distance in patients with peripheral vascular disease treated with L-carnitine: a double-blind, cross-over study. Circulation, 77:767-773.

BROOKS, D.E., MCINTOSH, J.E.A. 1975 Turnover of carnitine by rat tissues. Biochemical Journal, 148:439-445.

BROQUIST, H.P. 1971 Unknown.

BROQUIST, H.P., BORUM, P.R. 1982 Carnitine biosynthesis, nutritional implications. Advanced Nutritional Research, 4:181-204.

BUCKINGHAM, J. 1982. Dictionary of Organic Compounds. 5th ed. New York. Chapman & Hall. 1:70-72.

CARLIN, J.I., REDDAN, W.G., SANJAK, M., HODACH, R. 1986 Carnitine metabolism during prolonged exercise and recovery in humans. European Journal of Applied Physiology, 61:1275-1278.

CARTER, A.L., ABNEY, T.O., LAPP, D.F. 1995. Biosynthesis and metabolism of carnitine. Journal of Child Neurology, 10:2S3-2S7.

CEDERBLAD, G., LINSTEDT, S. 1971. Excretion of L-carnitine in man. Clinical Chimica Acta, 33:117-123.

CEDERBLAD, G., LINSTEDT, S. 1972. A method for the determination of carnitine in the picomole range. Clinica Chimica Acta, 37:235-243.

CERRETELLI, P., MARCONI, C. 1990. L-carnitine supplementation in Humans. The effects on physical performance. International Journal of Sports Medicine, 11:1-14.

CHALMERS, R.A., ROE, C.R., TRACEY, B.M., STACEY, T.E., HOPPEL, C.L.,

MILLINGTON, D.S. 1983. Secondary carnitine insufficiency in disorders of organic acid metabolism: modulation of acyl-CoA/CoA ratios by L-carnitine *in vivo*. Biochemical Society Transactions, 11:724-725.

CHALMERS, R.A., ROE, C.R., STACEY, T.E., HOPPEL, C.L. 1984. Urinary excretion of L-carnitine and acylcarnitines by patients with disorders of organic acid metabolism: Evidence for secondary insufficiency of L-carnitine. Pediatric research, 18(12):1325-1328.

CHAN, F.C., POTTER, G.A., BARRIE, S.E., HAYNES, B.J., ROWLANDS, M.G., HOUGHTON, J., JARMAN, M. 1996. 3- and 4-Pyridylalkyl adamantanecarboxylates: Inhibitors of Human Cytochrome P450_{17 α} (17 α -Hydroxylase/C17,20-lyase). Potential nonsteroidal agents for the treatment of prostatic cancer. Journal of Medicinal Chemistry, 39:3319-3323.

CHIBA, S., ITO, M., MATSUMOTO, H. 1992. Amantadine treatment for refractory pain in patients with multiple sclerosis. Canadian Journal of Neurological Science, 19:309.

CRUSE, R.P., MAURO, S., TOWFIGHI, J., TREVISAN, C. 1984. Familial systemic carnitine deficiency. Archives of neurology, 41:301-306.

DE VIVO, D.C., TEIN, I. 1990. Primary and secondary disorders of carnitine metabolism. International Pediatrics, 5:134-141.

DIPALMA, J.R. 1988. Carnitine deficiency. Clinical pharmacology, 38(1):243-251

DONARUMA, L.G., VOGL, O. 1978. Polymeric drugs. Academic, New York.

ENGEL, A.G., ANGELINI, C. 1973. Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy – a new syndrome. Science, 179:899-901.

ENGEL, A.G., REBOUCHE, C.J., WILSON, D.M. 1981. Primary systemic carnitine deficiency. II. Renal handling of carnitine. Neurology, 31:818-25.

ENGEL, A.G., REBOUCHE, C.J. 1984. Carnitine metabolism and inborn errors. Journal of Inherited Metabolic Disease, 7(Suppl. 1):38-43.

ERIKSSON, B.O., GUSTAFSON, B., LINDSTEDT, S. 1989. Transport of carnitine into cells in hereditary carnitine deficiency. Journal of Inherited Metabolic Disease, 12:108-111.

FARNEBO, L.O., FUXE, K., GOLDSTEIN, M., MANBERG, B., UNGERSTEDT, U. 1971. Dopamine and noradrenaline releasing action of amantadine in the central and peripheral nervous system: a possible mode of action in parkinson's disease. European Journal of Pharmacology, 16:27-38.

FINOCCHIARO, G., TARONI, F., ROCCHI, M. 1991. cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase. Proceedings of the National Academy of Science in the U.S.A., 88:661-665.

FLOREY, K. 1983. Analytical profiles of drug substances. 1st ed. New York. Academic Press, Inc. 12:19-37.

FRENKEL, R.A., MCGARRY. 1980. Carnitine biosynthesis, metabolism and functions. 1st ed. New York. Academic Press, Inc. p.1-356.

FRITZ, I.B. 1959. Action of carnitine on long chain fatty acid oxidation by liver. American Journal of Physiology, 197:297-304.

GOA, K.L., BROGDEN, R.N., 1987. L-Carnitine. Drugs, 34:1-24

GOODMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P. 1991. Goodman and

Gilman's: The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York, N.Y.: Pergamon Press. p.1545-1552.

GRUNDEMANN, D., GORBOULEV, V., GAMABARYAN, S., VEYHI, M., KOEPEL, H. 1994. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. Nature, 372:549-552.

GULEWITSCH, V.S., KRIMBERG, R. 1905. Zur Kenntnis der Extraktivstoffe der Muskeln. II. Mitteilung-Über das Carnitin. Hoppe-Seylers Z. Physiologische Chemie, 45:326-330.

HARPER, P., WADSTRÖM, C., CEDERBLAD, G. 1983. Carnitine measurement in liver, muscle tissue, and blood in normal subjects. Clinical Chemistry, 39:592-599.

HAMILTON, J.W., LI, B.U.K., SHUG, A.L., OLSEN, W.A. 1986. Carnitine transport in human intestinal biopsy specimens. Gastroenterology, 91:10-16.

HEYMANN, E & MENTLEIN, R. 1981. Carboxylesterases-amidases. (*In*: Methods in Enzymology, Vol 77, New York: Academy Press), p.333-344.

HODGSON, E. & LEVI, P.E. 1994. Introduction to biochemical toxicology. 2nd ed. Connecticut, U.S.A: Appleton & Lange. p.75-132.

HULSE, J.D., ELLIS, S.R., HENDERSON, L.M. 1978. Carnitine biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 253:1654-1659.

HULSE, J.D., ELLIS, S.R., HENDERSON, L.M. 1980. Carnitine biosynthesis. Journal of Biological Chemistry, 255:1164-1151.

HULSMANN, W.C., SILIPRANDI, D., CIMAN, M., SILIPRANDI, N. 1964. Effects of carnitine on the oxidation of α -oxoglutarate to succinate in the presence of acetoacetate or pyruvate. Biochimica et Biophysica Acta, 93:166-168.

JOHNSON, D.W. 2000. A rapid screening procedure for the diagnosis of peroxisomal disorders: Quantification of very long-chain fatty acids, as dimethylaminoethyl esters, in plasma and blood spots, by electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Inherited Metabolic Disorders, 23:475-486.

KEARNEY, A.S., MEHTA, S.C., RADEBAUGH, G.W. 1992. Aqueous stability and solubility of CI-988, a novel "dipeptoid" cholecystokinin-B receptor antagonist. Pharmaceutical research, 9(8):1092-1095.

KONIG, W., GEIGER, R. 1970. Eine neue methode zur synthese von peptiden. Chemie Berigen, 103:788-798.

KOPPEL, C., TENCZER, J. 1985. A revision of the metabolic disposition of amantadine. Biomedical Mass Spectrometry, 12(9):499-501.

LAMMEK, B., WANG, Y., GAVRAS, I., GAVRAS, H. 1991. A novel bradykinin antagonist with improved properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 43:887-888.

LANDA, S. 1933. Unknown. Chemical Listings, 27:415.

LENON, D.F.L., STRATHAN, F.W., SHRAGO, E., NAGEE, F.J., MADDEN, M., HANSON, P., CARTER, A.L., 1983 Effects of acute moderate intensity exercise on carnitine metabolism in males and females. Journal of Applied Physiology, 55:789-795.

MAEBASHI, M., KAWAMURA, N., SATO, M., YOSHINAGA, K., SUZUKI, M. 1976. Urinary excretion of carnitine in man. Journal of Laboratory Clinical Medicine, 87:760-766.

MARCONI, C., SASI, G., CARPINELLI, A., CERRETELLI, P. 1985 Effects of L-carnitine loading on the aerobic and anaerobic performance of endurance athletes.

European Journal of Applied Physiology, 54:131-135.

MARTINUZZI, A., VERGANI, L., ROSA, M. 1991. L-carnitine uptake in differentiating human cultured muscle. Biochimica et Biophysica Acta, 1095:217-222.

MATHEWS, C.K., VAN HOLDE, K.E. 1990. Biochemistry. 1st ed. Canada. Benjamin Cummings Publishing Company. p.587-588.

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

MORRISON, R.T. & BOYD, R.N. 1987 Organic Chemistry. 5th ed. United States of America: Allyn & Bacon Inc. p.194-202.

MURTHY, M.S.R., PANDE, S.V. 1984. Mechanism of carnitine acylcarnitine translocase-catalyzed import of acylcarnitines into mitochondria. Journal of Biological Chemistry, 259:9082-89.

NOLTE, L. 1997. Die ontwikkeling van elektrospoei massaspektrometrie vir die bepaling van karnitienpalmitoëltransferase-I aktiwiteit in fibroblaste en leukosiete. Verhandeling vir M.SC.-graad, PU vir CHO.

OLPIN, S.E., MANNING, N.J., CARPENTER, K., MIDDLETON, B., POLLITT, R.J. 1992. Differential diagnosis of hydroxydicarboxylic aciduria based on release of ³H₂O from [9,10-³H]-myristic and [9,10-³H]-palmitic acids by intact cultured fibroblasts. Journal of Inherited Metabolic Disorders, 15:883-890.

PAIK, W.K., KIM, S. 1971. Protein methylation. Science, 174:114-119.

PAULSON, D.J., SHUG, A.L. 1984. Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta, 766:70-76.

PLIOPLYS, A.V., PLIOPLYS, S. 1997. Amantadine and L-carnitine treatment of chronic fatigue syndrome. Neuropsychobiology, 35:16-23.

PONS, R., DE VIVO, D.C. 1995. Primary and secondary carnitine deficiency syndromes. Journal of Child Neurology, 10, Suppl. 2, 2S8-2S24.

PRELOG, V., SEIWERTH, R. 1941. Unknown. Chemie Berigen, 74:1644,1769.

RAYMOND, C.F., VON SCHLEYER, P. 1964. Adamantane: consequences of the diamond structure. Chemical Review, 64:277-298.

REBOUCHE, C.J., ENGEL, A.G. 1980. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. Biochimica et Biophysica Acta, 630:22-29.

REBOUCHE, C.J., ENGEL, A.G. 1982. Carnitine transport in cultured muscle cells and skin fibroblasts from patients with primary systemic carnitine deficiency. In Vitro, 18:495-500.

REBOUCHE, C.J., MACK, D.L. 1984. Sodium gradient-stimulated transport of L-carnitine into renal brush border membrane vesicles: Kinetics, specificity and regulation by dietary carnitine. Archives of Biochemistry and Biophysics, 235:393-402.

REBOUCHE, C.J. 1991. Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. American Journal of Clinical Nutrition, 54:1147S-1152S.

REBOUCHE, C.J. 1992. Carnitine function and requirements during the life cycle. The FASEB Journal, 6:3379-3386.

RINGSDORF, H. 1975. Journal of Polymeric Science., Polymeric Symposium Edition, 51:135.

-
- ROE, C.R., COATES, P.M., 1995. Mitochondrial fatty acid oxidation disorder. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 7th ed. New York, McGraw-Hill, Inc. 1:1501-1533.
- ROSENBERG, G.A., APPENZELLER, O. 1988. Amantadine fatigue and multiple sclerosis. Canadian Journal of Neurological Science, 45:1104-1106.
- SANN, L., DIVRY, P., CARTIER, B., VIANEY-LAND, C., MAIRE, I. 1987. Ketogenesis in hypoglycemic neonates. Study of carnitine and dicarboxylic acids in neonatal hypoglycemia. Biology of Neonate, 52:80-85.
- SCAGLIA, F., WANG, Y., SINGH, R.H., DEMBURE, P.P., PASQUALI, M., FERNHOFF, P.M., LONGO, N. 1998. Unknown. Genet Med, 1:34-39.
- SCHOLTE, H.R., PEREIRA, R.R., DE JONGE, P.C., LUYT-HOWEN, I.E.M., VERDUIN, M.H.M., ROSS, J.D. 1990. Primary Carnitine Deficiency. Journal of Clinical Chemical Clinical Biochemistry, 28(5):351-357.
- SHEEHAN, I.C., HESS, G.P. 1955. Unknown. Journal of American Chemical Society, 77:1067.
- SHOJI, Y., KOIZUMI, A., KAYO, T., OHATA, T., TAKAHASHI, T., HARADA, K., TAKADA, G. 1998. Evidence for linkage of human primary systemic carnitine deficiency with D55436: a novel gene locus on chromosome 5q. American Journal of Human Genetics, 63:101-108.
- SILIPRANDI, N., SILIPRANDI, D., CIMAN, M. 1965 Stimulation of oxidation of mitochondrial fatty acids and acetate by acetylcarnitine. Biochemical Journal, 96:777-780.
- SILIPRANDI, N. 1985 Carnitine and its role in metabolism. Acta Medicine Romania,

SILIPRANDI, N. 1986 Transport and function of carnitine: Relevance to carnitine-deficient disease. Annals of the New York Academy of Science, 488:118-125.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry, 150:76-85.

SNOSWELL, A.M., KOUNDAKJIAN, P. 1972 Relationship between carnitine and coenzyme A esters in tissues of normal and alloxan-diabetic sheep. Biochemical Journal, 127:133.

STANLEY, C.A. 1987. New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. Advanced Pediatrics, 34:59-88.

STANLEY, C.A., DELEEuw, S., COATES, P.M., VIANEY-LIAUD, C., DIVRY, P., BONNEFONT, J.P., SAUDUBRAY, J.M., HAYMOND, M., TREFZ, F.K., BRENINGSTALL, G.N., WAPPNER, R.S., BYRD, D.J., SANSARICQ, C., TEIN, I., GROVER, W., VALLE, D., RUTLEDGE, S.L., TREEM, W.R. 1991. Chronic cardiomyopathy and weakness or acute coma in children with a defect in carnitine uptake. Annals of Neurology, 30:709-716.

STREMMEL, W. 1988. Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process. Journal of Clinical Investigation, 81:844-852.

TAMAI, I., OHASHI, R., NEZU, J., YABUUCHI, H., OKU, A., SHIMANE, M., SAI, Y., TSUJI, A. 1998. Molecular and functional identification of sodium ion-dependant, high affinity human carnitine transporter OCTN2. Journal of Biological Chemistry, 273:20378-20382.

TANG, N.L., GANAPATHY, V., WU, X., HUI, J., SETH, P., YUEN, P.M., FOK, T.F., HJELM, N.M. 1999. Mutations of OCTN2, an organic cation/carnitine transporter, lead to deficient cellular carnitine uptake in primary carnitine deficiency. Human Molecular Genetics, 8:655-660.

TEIN, I., BUKOVAC, S.W., XIE, Z. 1996. Characterization of the human plasmalemmal carnitine transporter in cultured skin fibroblasts. Archives of Biochemistry and Biophysics, 329:145-155.

TEIN, I., DE VIVO, D.C., BIERMAN, F., PULVER, P., DE MEIRLEIR, L.J., CVITANOVIC-SOJAT, L., PAGON, R.A., BERTINI, E., DIONISI-VICI, C., SERVIDEI, S., DI MAURO, S. 1990. Impaired skin fibroblast carnitine uptake in primary systemic carnitine deficiency manifested by childhood carnitine-responsive cardiomyopathy. Pediatric Research, 28:247-255.

TREEM, W.R., STANLEY, C.A., FINEGOLD, D.N., HALE, D.E., COATES, P.M. 1988. Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle and fibroblasts. The New England Journal of Medicine, 319:1331-1336.

TURNER, P.J., DEAR, J.W., FOREMAN, J.C. 2000. Involvement of kinins in hyperresponsiveness induced by platelet activating factor in the human nasal airway. British Journal of Pharmacology, 129(3):525-532.

TZUZUKI, N., HAMA, T., HIBI, T., KONISHI, R., FUTAKI, S., KITAGAWA, K., SEIYAKU, T. 1991. Adamantane as brain directed drug carrier for poorly absorbed drug: antinociceptive effects of [D-ala²] leu-enkephalin derivatives conjugated with the 1-adamantane moiety. Biochemical pharmacology, 41(4):R5-R8.

TZUZUKI, N., HAMA, T., KAWADA, M., HASUI, A., KONISHI, R., SHIWA, S., OCHI, Y., FUTAKI, S., KITAGAWA, K. 1994. Adamantane as a brain directed drug carrier for poorly absorbed drug. AZT derivatives conjugated with the 1-Adamantane moiety. Journal of Pharmaceutical Sciences, 83(4):481-484.

VEERKAMP, J.H., PAULUSSEN, R.J.A. 1987. Fatty acid transport in muscle: the role of fatty acid-binding proteins. Biochemical Society Transactions, 15:331-336.

VOET, D. & VOET, J. 1995. Biochemistry. 2nd ed. New York, N.Y: John Wiley & Sons, p.668.

WU, X., PRASAD, P.D., LEIBACH, F.H., GANAPATHY, V. 1998. CDNA sequence, transport function and genomic organization of human OCTN2. A new member of the organic cation transport family. Biochemical and Biophysical Research Communications, 246:589-595.

ZIEGLER, H.J., BRUCKNER, P., BINON, F. 1967. O-acylation of dl-carnitine chloride. Journal of Organic Chemistry, 32:3989-3991.

BEDANKINGS

Ek wil graag net vir die volgende mense dankie sê wat dit moontlik gemaak het om my studies te kon voltooi:

- My vrou, Deléne. Dankie dat jy aanhou glo in my en altyd daar is.
- My ouers omdat hulle niks ontsien het om die studies vir my moontlik te kon maak nie. Dankie ook Deon en Marlise vir julle ondersteuning.
- Al my familie en vriende vir volgehoue ondersteuning. 'n Spesiale dankie aan ouma Rina van Onselen.
- Prof. Mienie. Dankie vir die absolute voorreg om onder u te kon studeer. Die Here seën u vir elke opoffering wat u en u gesin gemaak het om dit alles moontlik te kon maak.
- Dr. Erasmus en die res van die metabolisme laboratorium. Dankie vir die voorreg om saam met julle te kon werk.
- Dr. van der Westhuizen. Dankie vir 'n oop deur en die rolmodel wat jy is.
- Dr. Potgieter vir die deurslaggewende insette om die studie te kon voltooi.
- Mev. Hutton (tannie Marie) vir die hulp met die taalversorging.
- Mev. van den Bergh (Izelle) vir die tegnieseversorging en insette oor die jare.
- Medestudente en kollegas. Dankie vir elkeen se inspirasie.
- Prof. Dippenaar. Dankie vir u bereidwilligheid om by te dra tot die suksesvolle voltooiing van die studie.
- My Hemelse Vader wat my gemaak het en getrou is aan Sy beloftes.
- **Life is hard but God is good, all the time.**

"I now know how I did it, but please don't ask me to do it again!"