

**OPKLARING VAN 'N KATABOLIESE WEG VIR
METIELSUKSIENSUUR IN DIE MENS**

**deur Elmarié Jonker
B.Sc, B.Sc Hons. (Biochemie)**

**Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die
graad Magister Scientiae aan die Potchefstroomse Universiteit vir
Christelike Hoër Onderwys.**

**Studieleier: Prof. L.J. Mienie
1995**

**'Eer aan God
in die hoogste hemel,
en vrede op aarde
in die mense in wie Hy
'n welbehae het!'**

Lukas 2:14

Aan Willie, Elsa en Willem Jonker

'...nor is there any better way to advance the proper practice of medicine than to give our mind to the discovery of the usual laws of nature by careful investigation of cases of rarer forms of disease.'

William Harvey, 1657

INHOUDSOPGAWE

	Bladsy
ABSTRACT	i
OPSOMMING	xvi
HOOFSTUK 1 : INLEIDING	1
HOOFSTUK 2 : LITERATUUROORSIG	5
2.1 INLEIDING	5
2.2 METIELSUKSIENSUUR	5
2.3 AANGEBORE METABOLIESE DEFEKTE WAARBY DIE VOOR- KOMS VAN METIELSUKSIENSUUR REEDS BESKRYF IS	7
2.3.1 Inleiding	7
2.3.2 Isovaleriaanasidemie	7
2.3.2.1 Ensiemdefek	7
2.3.2.2 Kliniese beeld	7
2.3.2.3 Biochemiese beeld	8
2.3.2.4 Die oorsprong van metielsuksiensuur in isovaleriaan- asidemie	9
2.3.2.5 Die moontlike katabolisme van metielsuksiensuur in isova- leriaanasidemie	11
2.3.2.6 Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in isova- leriaanasidemie beïnvloed	12
2.3.3 Propioonasidemie	14
2.3.3.1 Ensiemdefek	14
2.3.3.2 Kliniese beeld	14
2.3.3.3 Biochemiese beeld	14
2.3.3.4 Die oorsprong van metielsuksiensuur in propioonasidemie .	15
2.3.3.5 Die moontlike katabolisme van metielsuksiensuur in propioonasidemie	18
2.3.4 Die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte	18
2.3.4.1 Klassifikasie	18
2.3.4.2 Ensiemdefek	19
2.3.4.3 Kliniese beeld	19
2.3.4.4 Biochemiese beeld	21
2.3.4.5 Die oorsprong van metielsuksiensuur in die meervoudige- asiel-KoA-dehidrogenasedefekte	24

2.3.4.6	Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte beïnvloed	25
2.3.5	Mediumketting-asiel-KoA-dehidrogenasedefek (MCAD)	31
2.3.5.1	Ensiemdefek	31
2.3.5.2	Kliniese beeld	32
2.3.5.3	Biochemiese beeld	32
2.3.5.4	Die oorsprong van metielsuksiensuur in MCAD	33
2.3.5.5	Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in MCAD beïnvloed	35
2.3.6	Kortketting-asiel-KoA-dehidrogenasedefek (SCAD)	36
2.3.6.1	Ensiemdefek	36
2.3.6.2	Kliniese beeld	36
2.3.6.3	Biochemiese beeld	37
2.3.6.4	Die oorsprong van metielsuksiensuur in SCAD	37
2.3.6.5	Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in SCAD beïnvloed	37
2.3.6.6	Moontlike katabolisme van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte, MCAD en SCAD	39
2.4	SAMEVATTING	39
2.5	AANGEBORE METABOLIESE DEFEEKTE WAARBY METIEL-SUKSIENSUUR POTENSIEEL KAN GEVORM WORD	40
2.5.1	Geïsoleerde 3-metielkrotoniel-KoA-karboksilasedefek	40
2.5.1.1	Ensiemdefek	40
2.5.1.2	Kliniese beeld	40
2.5.1.3	Biochemiese beeld	41
2.5.2	3-Metielglutakoniël-KoA-hidratasedefek	42
2.5.2.1	Ensiemdefek	42
2.5.2.2	Kliniese beeld	42
2.5.2.3	Biochemiese beeld	43
2.5.3	3-Hidroksi-3-metielglutaarsuururie	43
2.5.3.1	Ensiemdefek	43
2.5.3.2	Kliniese beeld	43
2.5.3.3	Biochemiese beeld	44
2.5.4	Meervoudige karboksilasedefek	44

2.5.4.1	Ensiemdefek	44
2.5.4.2	Kliniese beeld	45
2.5.4.3	Biochemiese beeld	47
2.5.5	Metielmaloniel-KoA-mutasedefek	49
2.5.5.1	Ensiemdefek	49
2.5.5.2	Kliniese beeld	49
2.5.5.3	Biochemiese beeld	49
2.5.6	2-Metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek (β -ketotiolasedefek)	50
2.5.6.1	Ensiemdefek	50
2.5.6.2	Kliniese beeld	51
2.5.6.3	Biochemiese beeld	51
2.5.7	Suksinaatsemialdehid-dehidrogenasedefek (4-Hidroksibotter- suururie)	53
2.5.7.1	Ensiemdefek	53
2.5.7.2	Kliniese beeld	53
2.5.7.3	Urinêre organiese sure	53
2.6	DIE METABOLISME VAN METIELSUKSIENSUUR IN ANDER ORGANISMES	54
2.6.1	Die metabolisme van itakonsuur en mesakonsuur in soogdier- lewer	54
2.6.2	Die oksidasie van itakonsuur deur bereidings met gesuiwerde ensieme	54
2.6.3	Die metabolisme van metielsuksiensuur, itakonsuur, mesakon- suur en sitramaliensuur in bakterieë	57
2.7	DIE MOONTLIKE EFFEK VAN METIELSUKSIENSUUR	63
 HOOFSTUK 3 : EKSPERIMENTELE METODES		
3.1	INLEIDING	68
3.2	KLINIESE BESKRYWINGS VAN DIE PASIËNTE	68
3.2.1	Propioonasidemie	68
3.2.1.1	Pasiënt BB	68
3.2.1.2	Pasiënt ML	69
3.2.1.3	Pasiënt RK	69
3.2.1.4	Pasiënt JP	70

3.2.1.5	Pasiënt KM	70
3.2.1.6	Pasiënt WB	71
3.2.1.7	Pasiënt CA	71
3.2.2	Isovaleriaanasidemie	72
3.2.2.1	Pasiënt LS	72
3.2.2.2	Pasiënt HS	72
3.2.3	Glutaarsuururie tipe II	72
3.2.3.1	Pasiënt BW	72
3.2.3.2	Pasiënt MM	73
3.2.4	Etielmaloniel-adipiensuururie	73
3.2.4.1	Pasiënt MK	73
3.2.5	2-Metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek	74
3.2.5.1	Pasiënt T1264	74
3.3	METODES	74
3.3.1	Ekstraksie van organiese sure	74
3.3.2	Derivatisering	75
3.3.2.1	Bereiding van TMS-derivate van organiese sure	75
3.3.2.2	Bereiding van O-geasetileerde(-)-2-butielesters van organiese sure	75
3.4	ANALITIESE TEGNIEKE	76
3.4.1	Gaschromatografie van O-geasetileerde(-)-2-butielesters van organiese sure	76
3.4.2	Gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS)	76
3.4.3	Berekening van die konsentrasies van organiese sure	76
3.5	CHEMIESE SINTESEMETODES	77
3.5.1	Metielsitroensuur	77
3.5.2	3-Metieloksaalasynsuur	77
3.5.3	Dimetielsitroensuur	78
3.5.4	2,3-Dimetielappelsuur	78
3.5.5	3-Metielappelsuur	79

3.6	<i>IN VITRO</i> -ENSIEMREAKSIES	79
3.6.1	Die fumarasereaksie met mesakonsuur as 'n substraat	79
3.6.2	Die reaksie van asetiel-KoA en 3-metieloksaalasynsuur met sitraatsintetase	80
3.6.3	Die pirovaatkarboksilasereaksie met 2-ketobotfersuur en asetiel-KoA as substrate	80

HOOFSTUK 4 : RESULTATE EN BESPREKING

4.1	INLEIDING	81
4.2	DIE OMVORMING VAN METIELSUKSIENSUUR NA METIEL-FUMAARSUUR (MESAKONSUUR)	85
4.2.1	Inleiding en benaderingswyse	85
4.2.2	Resultate	87
4.2.2.1	Die teenwoordigheid van metielsuksiensuur en mesakonsuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, etielmalonieladipiensuururie, glutaarsuururie tipe II, 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek en propioonasidemie	87
4.2.3	Bespreking	88
4.2.4	Bepaling van die isomere van metielsuksiensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie en propioonasidemie	90
4.2.4.1	Benaderingswyse	90
4.2.4.2	Resultate	91
4.2.5	Bespreking	93
4.3	'N ONDERSOEK NA DIE VOORKOMS VAN SITRAKONSUUR IN DIE URIEN VAN PASIËNTE MET ISOVALERIAANASIDEMIE EN PROPIOONASIDEMIE	93
4.3.1	Motivering	93
4.3.2	Resultate	93
4.3.3	Bespreking	95
4.4	DIE PRODUK VAN FUMARASE MET MESAKONSUUR AS 'N SUBSTRAAT	95
4.4.1	Motivering	95
4.4.2	Benaderingswyse	96
4.4.3	Die teenwoordigheid van sitramaliensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, etielmalonieladipiensuururie en propioonasidemie	97

4.4.3.1	Resultate	97
4.4.3.2	Bespreking	98
4.5	DIE TEENWOORDIGHEID VAN 3-METIELAPPELSUUR IN DIE URIEN VAN PASIËNTE MET ISOVALERIAANASIDEMIE EN PROPIOONASIDEMIE	99
4.5.1	Benaderingswyse	99
4.5.2	Resultate en bespreking	99
4.6	BEPALING VAN DIE PRODUK VAN FUMARASE MET MESAKONSUUR AS 'N SUBSTRAAT	101
4.6.1	Motivering	101
4.6.2	Resultate	101
4.6.3	Bespreking	103
4.7	'N ONDERSOEK NA DIE KATABOLISME VAN 3-METIEL APPELSUUR	104
4.7.1	Benaderingswyse	104
4.7.2	Resultate	107
4.7.2.1	Die teenwoordigheid van 3-metieloksaalasynsuur in propioonasidemie	107
4.7.2.2	Die teenwoordigheid van 3-metieloksaalasynsuur in isovale- riaanasidemie	110
4.7.2.3	3-Metieloksaalasynsuur as 'n substraat vir die ensiem sitraat-(<i>si</i>)-sintetase	112
4.7.2.4	Die katabolisme van 3-metieloksaalasynsuur via 2-keto- bottersuur	115
4.7.3	Bespreking	116
4.8	DIE OORSPRONG VAN SITRAMALIENSUUR (2-HIDROKSI-2- METIELSUKSIENSUUR) IN PROPIOONASIDEMIEPASIËNTE . . .	117
4.8.1	Motivering	117
4.8.2	'n Ondersoek na die moontlike vorming van sitramaliensuur deur glioksilien-propioniel-KoA-kondensasie via 2-hidroksi- glutaarsuur	119
4.8.2.1	Benaderingswyse	119
4.8.2.2	Resultate	119

4.8.3	'n Ondersoek na die vorming van sitramaliensuur deur 'n kondensasiereaksie van laktiel-KoA en asetiel-KoA	120
4.8.3.1	Motivering	120
4.8.3.2	Benaderingswyse	123
4.8.3.3	Resultate	123
4.8.4	Bespreking	125

**HOOFSTUK 5 : SAMEVATTENDE BESPREKING, GEVOLGTREK-
KING EN SLOTBESKOING**

5.1	INLEIDING	127
5.2	DIE ISOMERE VAN METIELSUKSIENSUUR IN ISOVALERIAAN- ASIDEMIE, PROPIONASIDEMIE, GLUTAARSUURURIE TIPE II EN ETIELMALONIEL-ADIPIENSUURURIE	127
5.3	DIE KATABOLISME VAN METIELSUKSIENSUUR	128
5.4	GEVOLGTREKING Die moontlike effek van metielsuksiensuur en kataboliese produkte	129
5.5	SLOTBESKOING	130

HOOFSTUK 6 : LITERATUURVERWYSINGS	134
--	------------

BEDANKINGS	159
-----------------------------	------------

LYS VAN TABELLE

		Bladsy
Tabel 2.1	Konsentrasies van metielsuksiensuur in die urien van gesonde persone	6
Tabel 2.2	Konsentrasies van 4-hidroksi-isovaleriaansuur, metielsuksiensuur en mesakonsuur in 'n isovaleriaanasidemiepatiënt op verskillende tye	11
Tabel 2.3	Konsentrasies van metielsuksiensuur in die urien van 'n glutaarsuururie tipe II-pasiënt tydens 'n aanval en onder toestande van metaboliese beheer	27
Tabel 2.4	Konsentrasies van metielsuksiensuur in die urien van 'n etielmaloniel-adipiensuururiepasiënt tydens hospitalisasie	27
Tabel 2.5	Konsentrasies van metielsuksiensuur en plasmaglukose tydens 'n aanval en onder toestande van metaboliese beheer in 'n glutaarsuururie tipe II-pasiënt	29
Tabel 2.6	Konsentrasies van metielsuksiensuur, 3-hidroksi-isovaleriaansuur en plasma-ammonia in 'n glutaarsuururie tipe II-pasiënt tydens 'n aanval en onder toestande van metaboliese beheer	30
Tabel 2.7	Konsentrasies van metielsuksiensuur, glukose, asetoasynsuur en 3-hidroksi-bottersuur tydens 'n hipoglukemiese koma en normoglukemiese toestande in 'n volwasse glutaarsuururie tipe II-pasiënt	31
Tabel 2.8	Konsentrasies van metielsuksiensuur en 3-hidroksibottersuur in die urien van drie MCAD-pasiënte	36
Tabel 2.9	Die verband tussen die konsentrasies van metielsuksiensuur en hipoglukemie in 'n SCAD-pasiënt	38
Tabel 4.1	Konsentrasies van metielsuksiensuur en mesakonsuur in die urien van pasiënte met verskillende aangebore metaboliese defekte . .	87
Tabel 4.2	Konsentrasies van metielsuksiensuur, mesakonsuur en sitramaliensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, etielmaloniel-adipiensuururie en propioonasidemie	97
Tabel 4.3	Konsentrasies van 1,3-dimetielsitroensuur in die urien van propioonasidemie pasiënte	110

Tabel 4.4	Konsentrasies van 2-hidroksiglutaarsuur en sitramaliensuur in die urien van pasiënte met propioonasidemie en glutaarsuururie tipe II	120
Tabel 4.5	Konsentrasies van 2,3-dimetielappelsuur in die urien van propioonasidemiepasiënte	124

LYS VAN FIGURE

		Bladsy
Figuur 2.1	Die chemiese struktuur van D- en L-metielsuksiensuur	6
Figuur 2.2	Die metaboliese weg van metielsuksiensuur in isovaleriaan- asidemie	10
Figuur 2.3	Die anaboliese weë van metielsuksiensuur in propioonasidemie	16
Figuur 2.4	Die voorgestelde metaboliese weg van metielsuksiensuur deur die Krebsiklus	17
Figuur 2.5	Die anaboliese weë van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte	24
Figuur 2.6	Die anaboliese weg van metielsuksiensuur in MCAD en SCAD	34
Figuur 2.7	Die katabolisme van itakonsuur in soogdiere	56
Figuur 2.8	Die katabolisme van metielsuksiensuur in <i>Pseudomonas</i>	58
Figuur 2.9	Die degradasie van metielsuksiensuur deur <i>Trichosporon</i> <i>cutaneum</i>	59
Figuur 2.10	Die metabolisme van mesakonsuur in <i>Clostridium tetano-</i> <i>morphum</i>	60
Figuur 2.11	Die katabolisme van mesakonsuur en sitrakonsuur in <i>Pseudomonas</i>	61
Figuur 2.12	Die metabolisme van L-sitramaliensuur en mesakonsuur in <i>Clostridium tetanomorphum</i>	61
Figuur 2.13	Die katabolisme van L-sitramaliensuur in <i>Clostridium tetano-</i> <i>morphum</i>	62
Figuur 2.14	Die hidrasiereaksies van D-fumaarsuur en sitrakonsuur in <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	63
Figuur 4.1	Hipotetiese weg vir die katabolisme van metielsuksiensuur	84

Figuur 4.2	GC-profiel (vlamionisasie) van: (a) di-(-)-2-butielesters van (D,L)-metielsuksiensuur; (b) di-(-)-2-butielesters van metielsuksiensuur in die urien van isovaleriaanasidemiepatiënte (c) di-(-)-2-butielesters van metielsuksiensuur in die urien van propioonasidemiepatiënte	92
Figuur 4.3	Elektronionisasie-massaspektra van die TMS-derivate van mesakonsuur en sitrakonsuur	94
Figuur 4.4	Die voorgestelde reaksie vir die produkte van fumarase met mesakonsuur as 'n substraat	96
Figuur 4.5	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van chemies bereide 3-metielappelsuur	100
Figuur 4.6	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van 3-metielappelsuur in die urien van 'n propioonasidemiepatiënt	100
Figuur 4.7	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van die produk van fumarase met mesakonsuur as 'n substraat	102
Figuur 4.8	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van sitramaliensuur	103
Figuur 4.9	'n Voorstelling van moontlike kondensasiereaksies, gekataliseer deur sitraat-sintetase met 3-metieloksaalasynsuur as een van die substrate	106
Figuur 4.10	a, b en c Elektronionisasie-massaspektra van die chemies bereide enantiomeerpare van 1,3-dimetielsitroensuur-tetra-TMS	108
Figuur 4.11	Moontlike diastereo-isomere van 1,3-dimetielsitroensuur	109
Figuur 4.12	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-ester van 1,3- dimetielsitroensuur in die urien van propioonasidemiepatiënte	109
Figuur 4.13	Elektronionisasie-massaspektrum van die chemies bereide metiel- sitroensuur-tetra-TMS	111
Figuur 4.14	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van metiel- sitroensuur in die urien van 'n isovaleriaanasidemiepatiënt	111
Figuur 4.15	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van chemies bereide 3-metieloksaalasynsuur	113

Figuur 4.16	a en b Elektronionisasie-massaspektra van die TMS-derivate van die isomere van metielsitroensuur, soos deur sitraatsintetase met 3-metieloksaalasynsuur as 'n substraat gevorm	114
Figuur 4.17	Die voorgestelde vorming van sitramaliensuur deur 'n kondensasie van glioksaalsuur met propioniel-KoA via 2-hidroksi-glutaarsuur	118
Figuur 4.18	Die voorgestelde vorming van sitramaliensuur deur kondensasie van laktiel-KoA en asetiel-KoA	122
Figuur 4.19	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van chemies bereide 2,3-dimetielappelsuur	124
Figuur 4.20	Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van 2,3-dimetielappelsuur in die urien van 'n propioonasidemie-pasiënt	125
Figuur 5.1	Die katabolisme van metielsuksiensuur volgens hierdie studie .	133

ABSTRACT

ELUCIDATION OF A CATABOLIC PATHWAY FOR METHYLSUCCINIC ACID IN MAN

(Original title: Opklaring van 'n kataboliese weg vir metielsuksiensuur in die mens).

Methylsuccinic acid (3-carboxybutyric acid) is an induced metabolite excreted in high concentrations in the urine of patients with isovaleric acidemia, propionic acidemia, glutaric aciduria type II and ethylmalonic adipic aciduria. This substance is produced by ω -oxidation and carboxylation respectively. It is not known whether methylsuccinic acid can be catabolized although the presence of methylfumalic acid (mesaconic acid) in isovaleric acidemia has been described which indicates the possible degradation of methylsuccinic acid. The presence of mesaconic acid in glutaric aciduria type II and ethylmalonic adipic aciduria has however not yet been documented.

By identifying the isomers of methylsuccinic acid produced by the different anabolic pathways an indication could be obtained whether methylsuccinic acid will be catabolized, since D-methylsuccinic acid inhibits succinate dehydrogenase while L-methylsuccinic acid acts as a substrate for this enzyme.

Gaschromatographic-mass spectrometric (GC-MS) analyses were conducted on the urine of patients with propionic acidemia, isovaleric acidemia, glutaric aciduria type II and ethylmalonic adipic aciduria. Firstly the presence of the isomers of methylsuccinic acid could be determined by these analyses. Secondly and more importantly a catabolic pathway for methylsuccinic acid could be ascertained by employing a biochemical analytical approach. In this way the induced metabolites were predicted on the basis of the knowledge of the mechanisms of existing metabolic pathways. The suggested pathway was investigated by further analyses of the involved substances in the urine of patients with the inborn metabolic disorders mentioned, as well as by studying the products of *in vitro* enzyme reactions.

Both isomers of methylsuccinic acid were present in isovaleric acidemia as well as propionic acidemia. This indicates that the formation of methylsuccinic acid by ω -oxidation does not occur stereospecifically. Although the isomers of methylsuccinic acid in the urine of patients with glutaric aciduria type II and ethylmalonic adipic aciduria could not be investigated completely it appears that at least the L-isomer is present in ethylmalonic adipic aciduria. This indicates that carboxylation of butyryl-CoA produces at least L-methylsuccinic acid.

According to this study the L-methylsuccinic acid is converted to mesaconic acid by succinate dehydrogenase. Mesaconic acid is converted to 3-methylmalic acid by fumarase. This substance is dehydrogenated by malate dehydrogenase to 3-methyloxaloacetic acid. The latter could be catabolized by two possible pathways, namely (i) by pyruvate carboxylase to 2-ketobutyric acid and (ii) by condensation with propionyl-CoA or acetyl-CoA to give rise to 1,3-dimethylcitric acid and methylcitric acid respectively.

Citramalic acid (2-methylmalic acid) is sometimes excreted in very high concentrations by propionic acidemia patients. It appears from this study that citramalic acid is not produced in the catabolism of methylsuccinic acid. It was therefore proposed that it originates through the condensation of lactyl-CoA with acetyl-CoA by 3-methylglutaryl-CoA synthase as the responsible enzyme for the reaction. The presence of 2,3-dimethylmalic acid in the urine of propionic acidemia patients supports this suggestion. The latter substance possibly arises through a condensation similar to the above mentioned with propionyl-CoA and pyruvyl-CoA or lactyl-CoA as the substrates.

Methylsuccinic acid and its catabolic products may through inhibition of the Krebs cycle be associated with clinical-biochemical phenomena like hyperammonemia, hypoglycemia and ketoacidosis.

Further studies could be conducted to fully elucidate and confirm the catabolism of methylsuccinic acid in man by stable isotope labeling analyses.

Results from this study have been presented at one national conference:

JONKER, E., MIENIE, L.J., ERASMUS, E. & DE WET, W.J.

'A new metabolite explains the origin of citramalic acid in propionic acidemia.'

The Eleventh National Congress of the South-African Biochemical Society: Sun City (June 1992).

Results from this study will be published:

MIENIE, L.J., VAN DYK, U., JONKER, E., ERASMUS, E. & DE WET, W.J. 1994.

2-Hydroxy-2,3-dimethylsuccinic acid: An indication of the origin of citramalic acid in propionic acidaemia.

OPSOMMING

OPKLARING VAN 'N KATABOLIESE WEG VIR METIELSUKSIENSUUR IN DIE MENS

Metielsuksiensuur (3-karboksibottersuur) is 'n geïnduseerde metaboliet wat in hoë konsentrasies in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, propioonasidemie, glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie uitgeskei word. Hierdie verbinding word onderskeidelik deur ω -oksidase en karboksilering gevorm. Dit is nie bekend of metielsuksiensuur gekataboliseer kan word nie hoewel die teenwoordigheid van metielfumaarsuur (mesakonsuur) in isovaleriaanasidemie beskryf is, wat die moontlike degradasie van metielsuksiensuur aandui. Die teenwoordigheid van mesakonsuur is egter nog nie in glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie beskryf nie.

Deur die identifisering van die isomere van metielsuksiensuur wat deur die verskillende anaboliese weë gevorm word, kon 'n aanduiding verkry word of metielsuksiensuur afgebreek sal word aldan nie aangesien D-metielsuksiensuur 'n inhibeerder van suksinaatdehidrogenase is, terwyl L-metielsuksiensuur as 'n substraat vir hierdie ensiem kan optree.

Gaschromatografiese-massaspektrometriese (GC-MS)-analises is op die urien van pasiënte met propioonasidemie, isovaleriaanasidemie, glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie uitgevoer. Eerstens kon die teenwoordigheid van die isomere van metielsuksiensuur hierdeur bepaal word. Tweedens en belangriker, kon daar deur van 'n biochemies-analitiese benadering gebruik te maak, 'n kataboliese weg vir metielsuksiensuur vasgestel word. Op hierdie wyse is die geïnduseerde metaboliete op grond van die kennis van die meganismes van bestaande metaboliese weë voorspel. Die voorgestelde weg is deur verdere analises van die betrokke verbindings in die urien van pasiënte met die genoemde aangebore metaboliese defekte asook die bestudering van die produkte van *in vitro*-ensiemreaksies, ondersoek.

Beide isomere van metielsuksiensuur het in isovaleriaanasidemie en propioonasidemie voorgekom. Dit dui daarop dat die vorming van metielsuksiensuur deur ω -oksidase nie stereospesifiek plaasvind nie. Hoewel die metielsuksiensuur-isomere in die urien van pasiënte met glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie nie volledig ondersoek kon word nie, wil dit voorkom of minstens die L-isomeer in etielmaloniel-adipiensuururie teenwoordig is. Dit dui daarop dat karboksilering van butiriel-KoA minstens aan L-metielsuksiensuur oorsprong gee.

Volgens hierdie studie word L-metielsuksiensuur deur suksinaatdehidrogenase na mesakonsuur omvorm. Mesakonsuur word deur fumarase tot 3-metielappelsuur omvorm. Hierdie verbinding word deur malaatdehidrogenase na 3-metieloksaalasynsuur gedehidrogeer. 3-Metieloksaalasynsuur kan deur twee moontlike weë gekataboliseer word, naamlik (i) deur pirovaatkarboksilase na 2-ketobottersuur, wat deur die normale metaboliese weg na suksiniel-KoA afgebreek kan word en (ii) deur kondensasie met propioniel-KoA en asetiel-KoA om onderskeidelik aan 1,3-dimetielsitroensuur en metielsitroensuur oorsprong te gee.

Sitramaliensuur (2-metielappelsuur) word soms in baie hoë konsentrasies deur propioonasidemiepasiënte uitgeskei. Dit blyk volgens hierdie studie dat sitramaliensuur nie 'n produk van die metielsuksiensuurkatabolisme is nie. Gevolglik is voorgestel dat dit deur kondensasie van laktiel-KoA met asetiel-KoA deur 3-hidroksimetielglutariel-KoA-sintetase as die betrokke ensiem, gevorm word. Die teenwoordigheid van 2,3-dimetielappelsuur in die urien van propioonasidemiepasiënte ondersteun hierdie voorstelling. Laasgenoemde verbinding ontstaan moontlik deur 'n soortgelyke kondensasie aan eersgenoemde, met propioniel-KoA en piroviel-KoA of laktiel-KoA as substrate.

Metielsuksiensuur en die kataboliese produkte daarvan mag moontlik deur inhibisie van die Krebs siklus met klinies-biochemiese beelde soos hiperammonemie, hipoglukemie en ketoasidose verband hou.

Verdere studies kan onderneem word om die katabolisme van metielsuksiensuur in die mens volledig deur stabiele-isotoopmerkingsanalises op te klaar en te bevestig .

Resultate van hierdie studie is by een nasionale kongres aangebied:

JONKER, E., MIENIE, L.J., ERASMUS, E. & DE WET, W.J.

'A new metabolite explains the origin of citramalic acid in propionic acidemia'.

Die Elfde Nasionale Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging: Sun City
(Junie 1992).

Resultate van hierdie studie sal gepubliseer word:

MIENIE, L.J., VAN DYK, U., JONKER, E., ERASMUS, E. & DE WET, W.J. 1994.

2-Hydroxy-2,3-dimethylsuccinic acid: An indication of the origin of citramalic acid in propionic acidaemia.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Diagnostiese metaboliëte in aangebore metaboliese afwykings is vandag goed bekend. 'n Diagnose kan dus op grond van 'n kenmerkende metabolietprofiel in die urien gemaak word sonder bevestiging van die diagnose deur ensiemtoetse soos voorheen vereis was. Die kliniese beelde van die siektetoestande varieer egter geweldig, tussen individue onderling, sowel as in 'n enkele individu. Min is nog bekend aangaande die biochemiese basis van hierdie kliniese simptome.

'n Aantal gemeenskaplike kenmerke word by die organiese suururieë (die grootste groep aangebore metaboliese afwykings) gevind, waaronder hipoglukemie, ketose, metaboliese asidose en hiperammonemie (Seashore & Rinaldo, 1993:319). Die vraag kan gevra word of daar 'n gemeenskaplike verbinding bestaan wat met hierdie kliniese verskynsels verband hou. Deur jare se ondersoek van pasiënte in die siftingsprogram vir aangebore metaboliese defekte van die Departement Biochemie aan die PU vir CHO, wil dit voorkom of metielsuksiensuur hier 'n rol mag speel.

Metielsuksiensuur (3-karboksibottersuur) word in beide die D- en die L-isomere aangetref en dit is nie bekend watter isomere by die verskillende siektetoestande gevorm word nie. Dit is ook nie bekend of metielsuksiensuur gekataboliseer kan word nie. D-Metielsuksiensuur tree as 'n inhibeerder van suksinaatdehidrogenase op (Veeger *et al.*, 1969:99) wat impliseer dat dit nie afgebreek kan word nie, of minstens nie deur suksinaatdehidrogenase nie. L-Metielsuksiensuur daarenteen, kan volgens die literatuur minstens een stap verder gekataboliseer word, naamlik tot metielfumaarsuur deur suksinaatdehidrogenase (Truscott *et al.*, 1981:188).

Aangesien dit blyk dat D-metielsuksiensuur nie gekataboliseer word nie, sou dit moontlik met die kliniese simptome wat by die pasiënte gevind word, verband kon hou. L-Metielsuksiensuur sou moontlik wel verder afgebreek kon word maar steeds kliniese

gevolge deur die vorming van addisionele toksiese metaboliete in die betrokke kataboliese weg hê.

Uit die voorafgaande is die probleemstelling vir hierdie studie as volg geformuleer:
Ten eerste, kan metielsuksiensuur volledig afgebreek word sonder enige verdere kliniese gevolge of word daar addisionele toksiese metaboliete deur die katabolismeweg gevorm?
Ten tweede, indien metielsuksiensuur wel gekataboliseer word, hoe verloop hierdie katabolismeweg?

Aangesien daar in hierdie studie op pasiënte met organiese suururieë gefokus word, volg daar nou 'n kort agtergrond oor hierdie siektetoestande.

Agtergrond tot die organiese suururieë

Aangebore metaboliese defekte reflekteer genetiese mutasies wat tot die produksie van proteïene met gemodifiseerde primêre strukture lei (Rodwell, 1990:284). Hierdie defekte word meestal outosomaal resessief oorgeërf (Kohlschütter, 1983:191). Sommige veranderinge in die primêre strukture van ensieme mag min of geen effek hê nie, terwyl ander die drie dimensionele struktuur van katalitiese of regulatoriese sentra drasties mag verander. Die gewysigde of mutante ensiem mag veranderde katalitiese aktiwiteit (lae V_{max} of hoë K_m) besit of 'n veranderde vermoë om aan 'n allosteriese reguleerder van die ensiem se katalitiese aktiwiteit te bind. 'n Verskeidenheid mutasies mag in dieselfde kliniese siekte resulteer (Rodwell, 1990:284), soos ook blyk uit die toestande wat in die onderhawige studie bestudeer is.

'n Mutasie wat tot 'n defektiewe ensiem lei, lei gewoonlik tot aansienlike akkumulering van 'n intermediêr wat 'n substraat vir die betrokke ensiem is en 'n aansienlike verlaging van alle intermediêre na daardie stap in die weg (Zubay, 1988:639-640). So 'n ensiemgebrek lei tot ernstige metaboliese, biochemiese en kliniese versteurings. Biochemiese afwykings is veral geleë in die voorkoms van abnormale metaboliete (meestal in verhoogde konsentrasies) of normale metaboliete in abnormale konsentrasies. Elke defek word deur 'n karakteristieke metabolietprofiel in die urien gekenmerk.

Hierdie toestande presenteer met ernstige siekte, meestal in die neonatale of vroeë infantiele lewensfase en resulteer in onomkeerbare breinskade of is fataal indien dit onbehandel bly (Burton, 1987:359).

Die organiese suururieë verteenwoordig die grootste groep van die aangebore metaboliese afwykings en kan gedefinieer word as metaboliese defekte waar die pasiënte verhoogde konsentrasies organiese sure in hul urien uitskei. Die organiese suururieë manifesteer met 'n wye spektrum van nie-spesifieke simptome (Brandt, 1984:23). Algemene simptome sluit voedingsprobleme, metaboliese asidose, respiratoriese probleme, hipotonie, letargie, koma, hipoglukemie, ketose, hiperammonemie, vomering en vertraagde groei en ontwikkeling in (Saudubray *et al.*, 1989:26; Seashore & Rinaldo, 1993:319). Proteïenintoleransie kom by afwykings van die aminosuurmetabolisme (wat ook onder die organiese suururieë resorteer) voor (Burton, 1987:360). Pasiënte toon ook 'n verhoogde geneigdheid tot en 'n verlaagde weerstand teen infeksies (Brandt, 1984:24), waardeur die siekte-aanvalle dikwels gepresipiteer word (Levy & Shapira, 1993:27). Siekte-aanvalle word ook deur ander kataboliese toestande gepresipiteer (Kohlschütter, 1983:194).

'n Vroeë diagnose en spoedige aanvang van toepaslike behandeling, indien beskikbaar, is essensieël ten einde sterfte of verstandelike vertraging te voorkom (Burton, 1987:359, Seashore & Rinaldo, 1993:318).

Hoewel die voorkoms van individuele aangebore metaboliese defekte betreklik laag is, is die gesamentlike voorkoms daarvan omvangryk. Daar bestaan ook min twyfel dat baie nog ongediagnoseer bly (Burton, 1987:359). Die belang van die studieveld word beklemtoon deur die hoë morbiditeit en mortaliteit van hierdie siektetoestande (Seashore & Rinaldo, 1993:318).

As gevolg van die ensiemgebrek, poog die liggaam om 'n metaboliese balans te handhaaf deur 'n verhoogde gebruik van alternatiewe metaboliese weë. Dit is metaboliese paaie wat normaalweg slegs tot 'n geringe mate by 'n gesonde individu (oftewel 'n individu wat nie aan 'n aangebore metaboliese defek lei nie) aktief is, maar wat as gevolg van die

onvermoë van sy metabolisme om die normale weë te volg, tot 'n groot mate gebruik word. 'n Wye netwerk van alternatiewe metaboliese weë kan in 'n pasiënt aktief wees met akkumulering van groot hoeveelhede van die produkte van hierdie alternatiewe weë.

Volgens Gregersen (1985:44) verteenwoordig die biologiese gevolge van 'n aangebore metaboliese defek die eindpunte van baie reaksievolgordes, wat die primêre defekte aan die gevolge koppel.

Die primêre doel van navorsing oor die metabolisme in aangebore metaboliese defekte is dan ten eerste om die alternatiewe weë op te klaar. Tweedens is 'n begrip van die aard en oorsprong van kliniese simptome by hierdie pasiënte ook van sodanige studies afhanklik ten einde terapeutiese maatreëls te beplan. Dit is dus van primêre belang om 'n totale beeld van die kliniese en biochemiese toestand in 'n bepaalde defek te verkry ten einde effektiewe behandeling te kan toepas. Verder lei die opklaring van metaboliese weë by hierdie siektetoestande tot 'n beter begrip en uitbreiding van kennis oor die normale metaboliese prosesse in die mens. Gregersen (1985:44) stel dit as volg:

"...The purpose of the research must be to elucidate these links and chain them together. For two reasons. Firstly it naturally helps a more rational therapy of the disease in question and secondly the investigations of these unusual processes can open our eyes to the same processes in the healthy individual."

Die katabolisme van metielsuksiensuur in die mens en spesifiek in isovaleriaanasidemie, propioonasidemie, glutaarsuururie tipe II en etielmalonieladipiensuururie, is in die onderhawige studie ondersoek en sal in hierdie verhandeling bespreek word. Daar sal eerstens 'n literatuuroorsig gebied word aangaande die voorkoms en metabolisme van metielsuksiensuur in lewende organismes sover bekend (Hoofstuk 2). Die eksperimentele protokol sal in Hoofstuk 3 weergegee word. Die resultate van die studie word in Hoofstuk 4 vermeld en bespreek. Hoofstuk 5 bied laastens 'n samevattende bespreking, gevolgtrekking en enkele voorstelle vir toekomstige studies.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

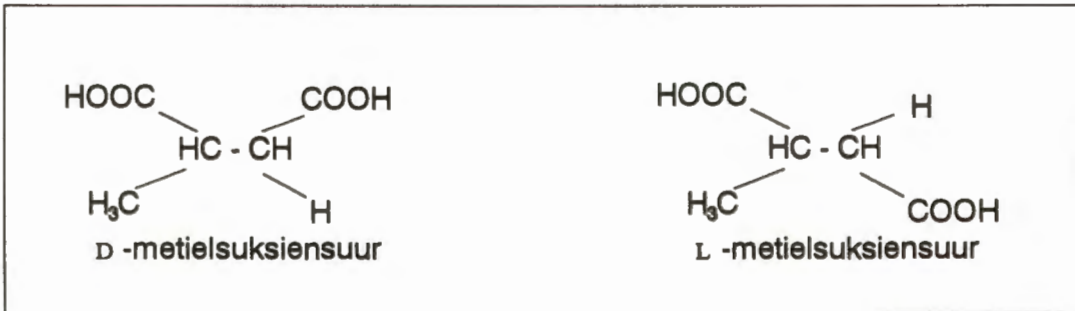
2.1 INLEIDING

Hierdie hoofstuk word aan tersaaklike agtergrondkennis uit die literatuur gewy. Die teenwoordigheid van metielsuksiensuur in gesonde persone word onder 2.2 bespreek. Aangebore metaboliese defekte waarby die voorkoms van metielsuksiensuur uit die literatuur bekend is, word onder 2.3 bespreek. Die anabolisme van metielsuksiensuur in die mens sal onder 2.3.2.4, 2.3.3.4, 2.3.4.5, 2.3.5.4 en 2.3.6.4 weergegee word aangesien anaboliese weë dikwels met kataboliese weë ooreenstem en moontlike leidrade aangaande die katabolisme van metielsuksiensuur sou kon verskaf. Waar dit bekend is sal die moontlike kataboliese weë van metielsuksiensuur in die betrokke metaboliese defekte ook getoon word (2.3.2.5, 2.3.3.5 en 2.3.6.6). Defekte waarby metielsuksiensuur potensieel kan voorkom maar nog nie vir die voorkoms daarvan ondersoek is nie, sal oorsigtelik onder 2.5 bespreek word. Hierdeur sal 'n aanduiding verkry kan word of daar ooreenkomste met die eersgenoemde groep defekte bestaan. Die metabolisme van metielsuksiensuur in ander organismes as die mens sal ook kortliks weergegee word (2.6) met die oog op die soeke na 'n kataboliese weg vir die verbinding. Die moontlike kliniese effek van metielsuksiensuur sal laastens bespreek word (2.7).

2.2 METIELSUKSIENSUUR

Metielsuksiensuur (3-karboksibottersuur) word in die D- en die L-vorme aangetref (Montgomery *et al.*, 1983:641, 644). Die chemiese strukture van hierdie twee isomere word in Figuur 2.1 getoon. Die verbinding kom in lae konsentrasies in die urien van gesonde persone voor (Pettersen & Stokke, 1973:316-321, Nakamura *et al.*, 1976:133, Marcell *et al.*, 1985:63) (Tabel 2.1). In pasiënte met sommige aangebore metaboliese defekte word dit in baie hoë konsentrasies in die urien uitgeskei (sien 2.3).

Metielsuksiensuur word ook in ander soogdiere en sekere mikro-organismes gemetaboliseer soos in 2.6 bespreek sal word.



Figuur 2.1 Die chemiese struktuur van van D- en L-metielsuksiensuur.

Tabel 2.1 Die konsentrasies van metielsuksiensuur in die urien van gesonde persone (Nakamura *et al.*, 1976:133).

	Volwasse nes	Kinders (2 - 12 jaar)	Pasgebore babas (eerste gepasseerde urien)	Swanger vroue (30 - 41 weke)
Metielsuksiensuurkonsentrasies (mmol/mol kreatinien)	1.1 ± 0.9	2.2 ± 0.8	1.4 ± 0.9	0.8 ± 0.5

2.3 AANGEBORE METABOLIESE DEFEKTE WAARBY DIE VOORKOMS VAN METIELSUKSIENSUUR REEDS BESKRYF IS

2.3.1 Inleiding

Metielsuksienuur is deur verskeie outeurs in verhoogde konsentrasies in die urien van isovaleriaanasidemie pasiënte aangetoon (Nakamura *et al.*, 1976:137, Lehnert, 1981:101, Truscott *et al.*, 1981:187, Shigematsu *et al.*, 1982:771, Montgomery *et al.*, 1983:641,644, Gregersen, 1985:30, Gerdes *et al.*, 1988:220). Dit is ook in die urien van pasiënte met propioonasidemie (Montgomery *et al.*, 1983:641), glutaarsuururie tipe II (Dusheiko *et al.*, 1979:1407, Goodman *et al.*, 1980:12, Henderson *et al.*, 1987:590, Yamaguchi *et al.*, 1991:442, Burlina *et al.*, 1991:1523) etielmaloniel-adipiensuururie (Mantagos *et al.*, 1979:1583, Gregersen *et al.*, 1982:861, Green *et al.*, 1985:68, Hoffmann *et al.*, 1990:337, Bell *et al.*, 1990:1780, Rinaldo *et al.*, 1991:218), mediumkettingasiel-KoA-dehidrogenasedefek (MCAD) (Gregersen *et al.*, 1983:181,185-186, Blom *et al.*, 1990:319) en kortkettingasiel-KoA-dehidrogenasedefek (SCAD) (Turnbull *et al.*, 1984:1233, Amendt *et al.*, 1987:1303, Vianey-Liaud *et al.*, 1987:178, Wood *et al.*, 1989:38, Sewell *et al.*, 1993:922) gevind. Elk van hierdie defekte sal vervolgens oorsigtelik bespreek word en waar dit bekend is sal die toepaslike anaboliese en kataboliese weë getoon word.

2.3.2 ISOVALERIAANASIDEMIE

2.3.2.1 Ensiemdefek

Isovaleriaan-KoA-dehidrogenase is defektief in hierdie siektetoestand (Pesce *et al.*, 1991:111). Die ensiem kataliseer die omskakeling van isovaleriaan-KoA na 3-metielkrotoniel-KoA in die L-leusienkatabolismeweg (Sweetman, 1989:793).

2.3.2.2 Kliniese beeld

Twee vorme van isovaleriaanasidemie word op grond van kliniese manifestering onderskei, naamlik (i) 'n akute neonatale tipe en (ii) 'n chroniese onderbroke tipe, met herhaalde aanvalle van ketose (Pesce *et al.*, 1991:111) wat op 'n later ouderdom as die

eerste tipe manifesteer en 'n milder kliniese verloop het (Hyman & Tanaka, 1986:59). Die neonatale tipe presenteer gewoonlik 'n paar dae na geboorte of selfs op die eerste lewensdag. Die baba begin voedings weier, vomeer, dehidreer en word letargies as gevolg van ernstige metaboliese asidose en ketose wat die dood kan veroorsaak. Die pasiënt het 'n kenmerkende reuk van 'sweetvoete' tydens kliniese onstabieleit. Verdere simptome sluit ernstige neurologiese afwykings, hipotermie en bloedings in (Sweetman, 1989:795).

Indien die krisistydperk oorleef word, kan die pasiënt die chroniese onderbroke vorm van die defek vertoon (Sweetman, 1989:795). Die chroniese tipe presenteer op 'n later stadium as die ernstige tipe, maar gewoonlik gedurende die eerste lewensjaar. Episodiese vomering, letargie en koma kom voor. Die karakteristieke 'sweetvoetrek' as gevolg van verhoogde isovaleriaansuurkonsentrasies is kenmerkend. Die meeste pasiënte met die chroniese vorm toon normale psigomotoriese ontwikkeling maar sommige ondervind ontwikkelingsvertraging en milde tot ernstige verstandelike vertraging. Alopesie kom in sommige gevalle voor (Sweetman, 1989:795)

2.3.2.3 Biochemiese beeld

Die volgende biochemiese kenmerke word met isovaleriaanasidemie geassosieer: ernstige metaboliese ketoasidose (Ando *et al.*, 1971:478, Duran *et al.*, 1982:125, Shigematsu *et al.*, 1983:201, Pesce *et al.*, 1991:111), hiperammonemie (Sweetman, 1989:795, Saudubray *et al.*, 1989:33, Goodman & Greene, 1991:32), trombositopenie, neutropenie, pansitopenie (Sweetman, 1989:795) en leukopenie (Ando *et al.*, 1971:478).

Urinêre organiese sure

Die diagnostiese urinêre metaboliet is N-isovaleriaanglisien (Duran *et al.*, 1982:125-126). Vrye isovaleriaansuur is slegs tydens kliniese aanvalle prominent (Nakamura *et al.*, 1976:139). Ander kenmerkende metaboliete is 3-hidroksi-isovaleriaansuur (Lehnert, 1981:249, Duran *et al.*, 1982:125), 4-hidroksi-isovaleriaansuur (Truscott *et al.*, 1981:187, Lehnert, 1981:101, Duran *et al.*, 1982:125), mesakonsuur (Truscott *et al.*, 1981:187, Duran

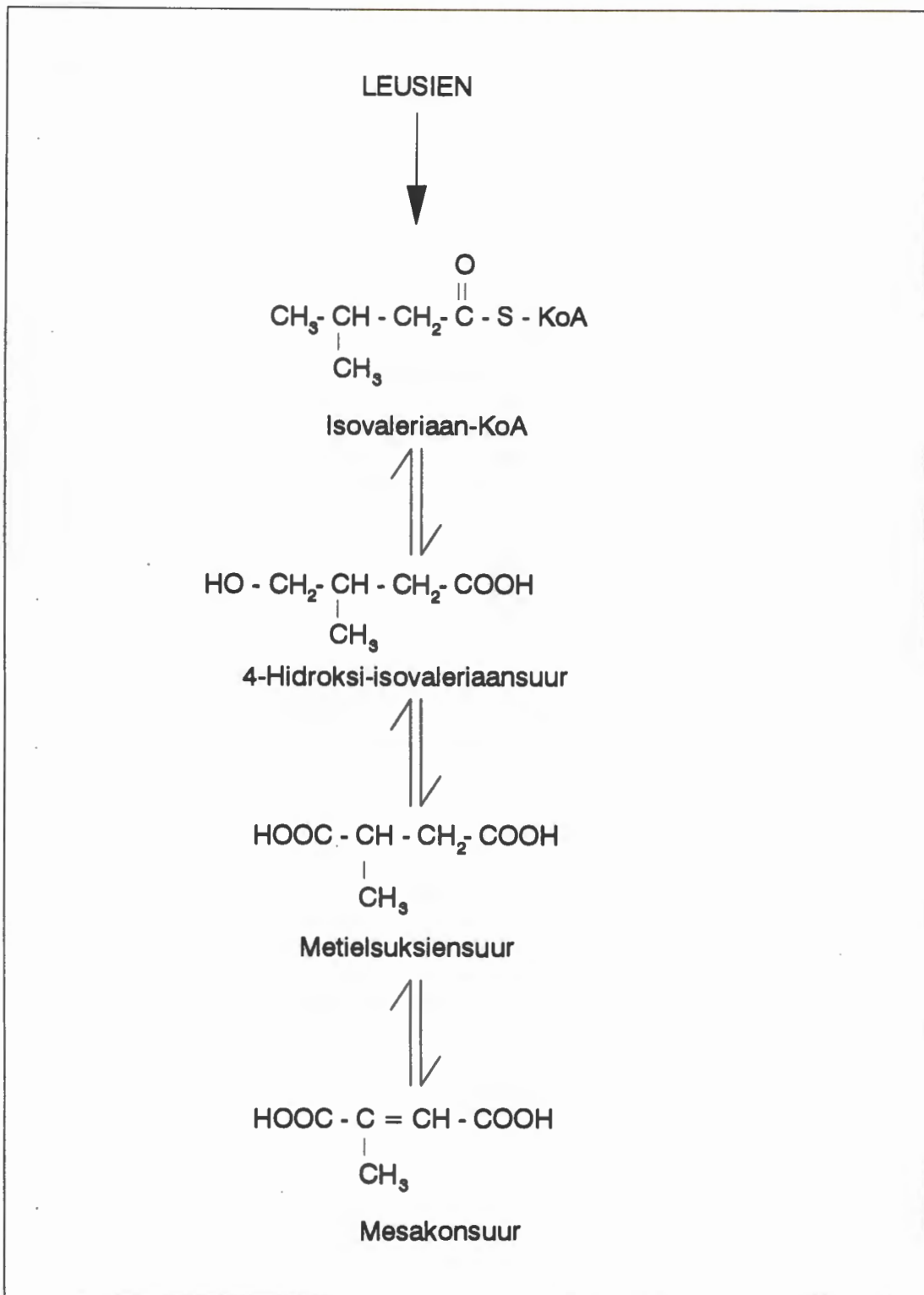
et al., 1982:125, Lehnert, 1983:207), metielsuksiensuur (Lehnert, 1981:101, Truscott *et al.*, 1981:187, Montgomery *et al.*, 1983:644), 3-hidroksi-isoheptanoësuur (Lehnert, 1981:101) en verskeie konjugeringsprodukte van isovaleriaansuur (Lehnert, 1983:207, Sweetman, 1989:796). 3-Metielkrotonsuur is in sommige pasiënte teenwoordig (Budd *et al.*, 1967:324). Al hierdie metaboliete is slegs tydens akute periodes prominent, terwyl redelike hoeveelhede N-isovaleriaanglisien ook tydens kliniese stabiliteit gevind word (Sweetman, 1989:796).

Vrye isovaleriaansuur kom nie tydens remissie voor nie (Nakamura *et al.*, 1976:139) maar die konsentrasies daarvan styg aansienlik tydens siekte-aanvalle (Sweetman, 1989:796) en veroorsaak die kenmerkende 'sweetvoetreuk' (Duran *et al.*, 1979:205). 4-Hidroksi-isovaleriaansuur, metielsuksiensuur en mesakonsuur is egters slegs tydens akute periodes in verhoogde konsentrasies teenwoordig (Sweetman, 1989:796).

2.3.2.4 Die oorsprong van metielsuksiensuur in isovaleriaanasidemie

Metielsuksiensuur word deur (ω -1)-oksidase van vrye isovaleriaansuur via 4-hidroksi-isovaleriaansuur gevorm (Truscott *et al.*, 1981:188, Lehnert & Niederhoff, 1981:281,283, Gregersen, 1985:30, Sweetman, 1989:796). Hierdie weg word in Figuur 2.2 getoon.

Verskeie navorsers het beide 4-hidroksi-isovaleriaansuur en metielsuksiensuur in die urien van isovaleriaanasidemiepasiënte gevind (Lehnert & Niederhoff, 1981:281, Truscott *et al.*, 1981:187,197, Lehnert, 1981:101). Die konsentrasies van 4-hidroksi-isovaleriaansuur en metielsuksiensuur soos deur Truscott *et al.* (1981:197) bepaal is, word in Tabel 2.2 getoon.



Figuur 2.2 Die metaboliese weg van metielsuksiensuur in isovaleriaanasidemie (Truscott *et al.*, 1981:188).

Tabel 2.2 Konsentrasies van 4-hidroksi-isovaleriaansuur, metielsuksiensuur en mesakonsuur in die urien van 'n isovaleriaanasidemiepatiënt op verskillende tye (Truscott *et al.*, 1981:197).

Konsentrasies in mmol/mol kreatinien			
	Tyd 1	Tyd 2	Tyd 3
4-Hidroksi-isovaleriaansuur	300	1100	
Metielsuksiensuur	700	700	800
Mesakonsuur	500	500	500

Volgens Budd *et al.* (1967:325) en Nakamura *et al.* (1976:137,139) akkumuleer vrye isovaleriaansuur slegs gedurende ketoasidotiese episodes soos ook die geval vir 4-hidroksi-isovaleriaansuur en metielsuksiensuur is (Lehnert & Niederhoff, 1981:281, Sweetman, 1989:796). Hiervolgens word die moontlikheid ondersteun dat metielsuksiensuur deur ω -oksidase van vrye isovaleriaansuur geproduseer word. Omdat die pasiënt van Truscott *et al.* (1981:200) ook 'n bakteriële infeksie gehad het is die moontlikheid dat metielsuksiensuur en mesakonsuur van bakteriële metabolisme afkomstig is, ondersoek. 4-Hidroksi-isovaleriaansuur en mesakonsuur is egter ook in die urien van 'n ander isovaleriaanasidemiepatiënt wat nie 'n infeksie gehad het nie, gevind (Truscott *et al.*, 1981:200).

2.3.2.5 Die moontlike katabolisme van metielsuksiensuur in isovaleriaanasidemie

Metielsuksiensuur en metielfumaarsuur (mesakonsuur) is deur Truscott *et al.* (1981:187,197), Lehnert (1983:207), Montgomery *et al.* (1983:644) en Sweetman (1989:796) in die urien van isovaleriaanasidemiepatiënte aangetoon. Volgens die resultate van Truscott *et al.* (1981:197) is daar 'n lineêre verwantskap ten opsigte van die konsentrasies van metielsuksiensuur en mesakonsuur (Tabel 2.2).

Truscott *et al.* (1981:200-201) en Sweetman (1989:796) het voorgestel dat metielsuksiensuur deur suksinaatdehidrogenase na mesakonsuur gedehidrogeneer word. Die metaboliese weg vir die afbraak van metielsuksiensuur na mesakonsuur soos deur Truscott *et al.* (1981:188) aangedui is, word in Figuur 2.2 weergegee.

2.3.2.6 Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in isovaleriaanasidemie beïnvloed

Volgens verskeie navorsers is die konsentrasies van metielsuksiensuur tydens periodes van ketoasidose verhoog (Nakamura *et al.*, 1976:137,139, Lehnert & Niederhoff, 1981:281, Lehnert, 1981:101, Shigematsu *et al.*, 1982:773).

Tydens 'n periode van ketoasidose het 4-hidroksi-isovaleriaansuur, die voorgestelde voorloper van metielsuksiensuur, die hoogste waarde twee dae nadat die plasma-isovaleriaansuurvlak op sy hoogste vlak was, bereik (Shigematsu *et al.*, 1983:201).

Metielsuksiensuur kom volgens Shigematsu *et al.* (1982:771) nie in pasiënte met die chroniese tipe isovaleriaanasidemie voor nie. Hierdie tipe word met 'n milder kliniese verloop geassosieer.

Nakamura *et al.* (1976:137) het 'n waarde van 16.2 mmol/mol kreatinien metielsuksiensuur tydens ketoasidose gevind, terwyl die konsentrasie tydens remissie 1.33 mmol/mol kreatinien was.

Shigematsu *et al.* (1982:771) het die variasie in die konsentrasies van die urinêre organiese sure tydens 'n aanval van ketoasidose gemoniteer. Metielsuksiensuur en mesakonsuur het saam met isovaleriaanglisien, 2-hidroksi-isobottersuur en 3-hidroksi-isovaleriaansuur tydens die aanval voorgekom. Die konsentrasies van metielsuksiensuur en mesakonsuur het tydens die aanval gestyg hoewel die hoogste konsentrasies daarvan nie met die ernstigste kliniese onstabieliteit tydens die aanval gekorreleer het nie. Die konsentrasies van 3-hidroksi-isovaleriaansuur, metielsuksiensuur en mesakonsuur het piekwaardes twee dae na die ergste kliniese siekte bereik, toe die herstelfase reeds begin

het. Isovaleriaansuur het wel 'n piekkonsentrasie getoon op die tyd toe die kliniese toestand die swakste was. Die outeurs het hierdie diskorrelasie in die konsentrasies van urinêre metielsuksiensuur en mesakonsuur met die kliniese verloop aan twee redes toegeskryf. 3-Hidroksi-isovaleriaansuur, metielsuksiensuur en mesakonsuur het eerstens 'n hoër renale opruiming as vrye isovaleriaansuur. Ten spyte van die teenwoordigheid van 'n groot hoeveelheid substraat (isovaleriaansuur) kan die ω - en (ω -1)-oksidasesisteme tweedens nie in die vroeë stadium van 'n ernstige siekte-aanval effektief funksioneer nie (Shigematsu *et al.*, 1982:771-774).

Groot hoeveelhede ketoonliggame (3-hidroksibottersuur en asetoasynsuur), melksuur en 2-hidroksibottersuur is op die tweede dag van die aanval deur die pasiënt uitgeskei. 3-Hidroksi-isovaleriaansuur, metielsuksiensuur, mesakonsuur en 2-hidroksi-isobottersuur was terselfertyd in klein hoeveelhede teenwoordig. Hierdie vier metaboliëte het hul hoogste waardes op die vierde dag van die aanval bereik, wanneer die konsentrasies van die eersgenoemde groep sure begin afneem het (Shigematsu *et al.*, 1982:773).

Shigematsu en medewerkers (1982:773) het voorgestel dat die vorming van ketoonliggame, melksuur en 2-hidroksibottersuur deur geakkumuleerde isovaleriaansuur geïnduseer word, wat deur inhibisie van oksidatiewe fosforilasie, die energiemetabolisme kan versteur. Dit is volgens hierdie outeurs moontlik dat daar 'n versteuring in die energiemetabolisme in kritiek siek pasiënte met betrekking tot generering van NADPH kan voorkom. Dit sou vir die inhibisie van die ω - en (ω -1)-hidroksilasesisteme verantwoordelik kon wees. NADPH is noodsaaklik vir die werking van die sitochroom- P_{450} -sisteem waardeur die ω - en (ω -1)-hidroksilasesisteme funksioneer.

In isovaleriaanasidemie is (ω -1)-hidroksilasie gedurende die aanvalle moontlik meer beskikbaar as ω -oksidasie, waarvoor kortkettingvetsure meer toeganklik is. Hiervolgens sal daar dus eerder 3-hidroksi-isovaleriaansuur as 4-hidroksi-isovaleriaansuur tydens akute episodes geproduseer word, wat kan verklaar waarom metielsuksiensuur ('n produk van 4-hidroksi-isovaleriaansuur) eers nadat die ergste simptome verby was 'n piekwaarde bereik het (Shigematsu *et al.*, 1982:773-774).

2.3.3 PROPIOONASIDEMIE

2.3.3.1 Ensiemdefek

'n Defek in propioniel-KoA-karboksilase is vir propioonasidemie verantwoordelik. Propioniel-KoA-karboksilase kataliseer die biotienafhanklike (Ohura *et al.*, 1993:863) omskakeling van propioniel-KoA na metielmaloniel-KoA, wat na suksiniel-KoA omgeskakel word (Thompson, 1992:134). Laasgenoemde word verder deur die Krebs siklus geoksideer (Barshop *et al.*, 1991:15).

2.3.3.2 Kliniese beeld

Propioonasidemie manifesteer meestal in die neonatale of vroeë infantiele periode (Thompson *et al.*, 1990:792) met aanvalle van ketose (Thompson, 1992:134), vomering, letargie (Thompson *et al.*, 1990:792), hipotonie (Barash *et al.*, 1989:105), koma en dikwels sterfte (Delvalle *et al.*, 1982:121). Dehidrasie, konvulsies en hepatomegalie (Wolf *et al.*, 1981:836) kan ook met die kliniese verloop gepaard gaan. Neurologiese abnormaliteite (Wolf *et al.*, 1981:837) en fisiese en verstandelike vertraging (DelValle, *et al.*, 1982:121) is verdere gevolge van propioonasidemie.

2.3.3.3 Biochemiese beeld

Die mees uitstaande biochemiese kenmerk van propioonasidemie is buitensporige ketoasidose (Soriano *et al.*, 1967:824, Wolf *et al.*, 1981:838, Rosenberg & Fenton, 1989:829) wat episodies voorkom (Barash *et al.*, 1989:103, Ohura *et al.*, 1991:41).

Die volgende sitologiese en ander biochemiese simptome kom voor: neutropenie, trombotopenie (Stork *et al.*, 1986:786), hiperammonemie (Goodman & Greene, 1991:31, Ohura *et al.*, 1991:41, Levy *et al.*, 1993:26), hiperglisienemie en hiperglisienurie (Barash *et al.*, 1989:103), 'n sekondêre karnitiengebreek (Kurczynski *et al.*, 1989:63), EEG-abnormaliteite (Barash *et al.*, 1989:103), breindegenerasie (Rosenberg & Fenton, 1989:829), osteoporose (Barash *et al.*, 1989:103) en vetinfiltrasie van die lewer (Wolf *et al.*, 1981:837). Laasgenoemde gaan met akkumulering van onewe kettinglengte vetsure (Wendel *et al.*, 1991:403) van 15 en 17 koolstowwe gepaard (Rosenberg & Fenton, 1989:830).

Urinêre organiese sure

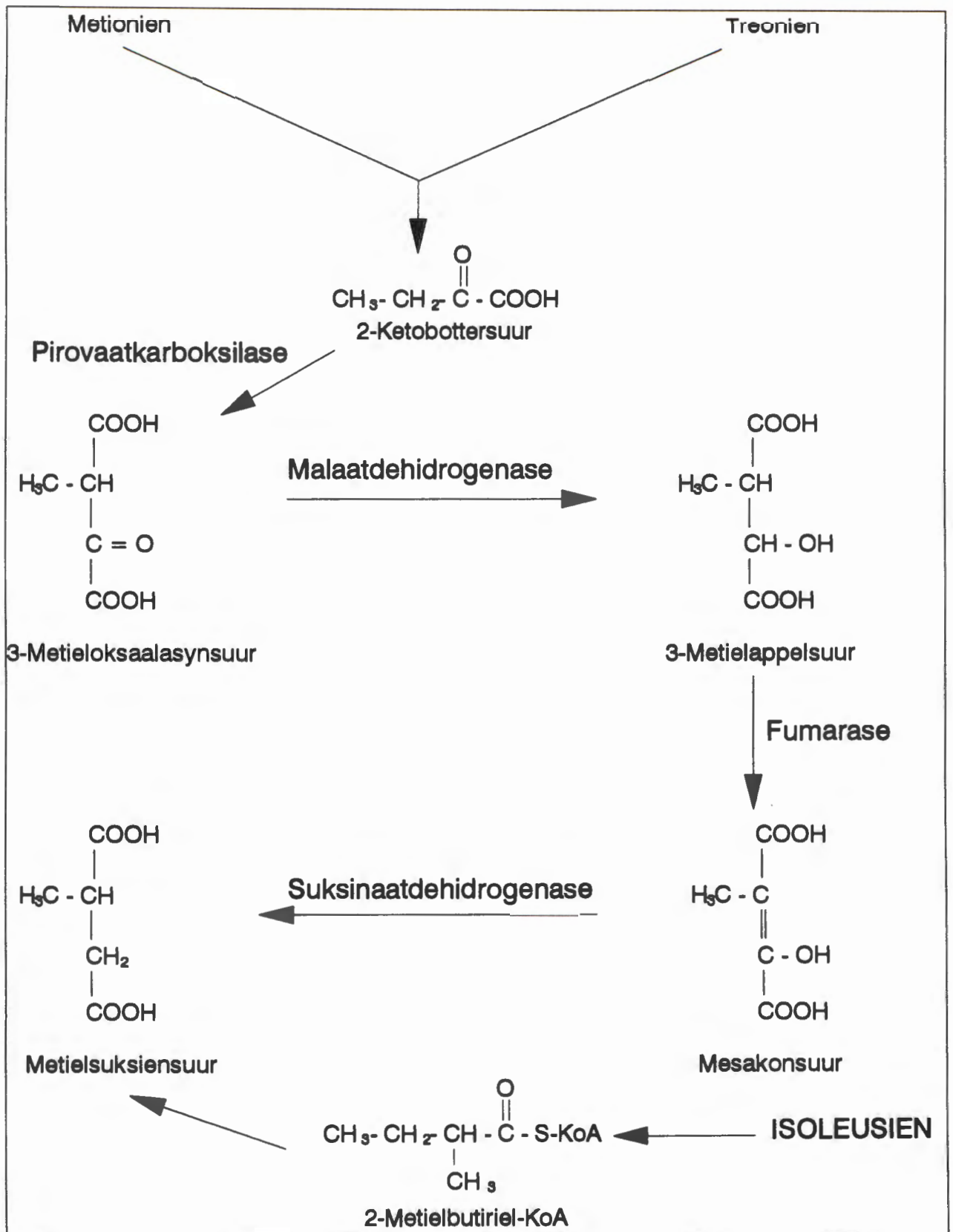
Die diagnostiese urinêre metaboliete is metielsitroensuur (Duran *et al.*, 1978), 3-hidroksipropioonsuur (Duran *et al.*, 1978:93), propionielglisien (Thompson & Chalmers, 1990:413), tiglielglisien (Rosenberg & Fenton, 1989:821) (soms tiglielsuur (Stork *et al.*, 1986:786)), glisien (Duran *et al.*, 1978:97, Barash *et al.*, 1989:103), butanoon, pentanoon en heksanoon (Soriano *et al.*, 1967:825).

'n Groot aantal addisionele metaboliete word tydens siekte-aanvalle uitgeskei. Hierdie verbindings sluit die volgende in: 3-hidroksi-valeriaansuur (Kuhara *et al.*, 1982:102), tiglielsuur, 3-keto-valeriaansuur (Kuhara *et al.*, 1982:102), 3-hidroksi-3-metielglutaarsuur (Chalmers & Lawson, 1982:304), 2-metiel-3-hidroksibottersuur (Kuhara *et al.*, 1982:102), 2-metiel-3-keto-valeriaansuur (Kuhara *et al.*, 1982:102), 2-metielbutirielglisien (Chalmers & Lawson, 1982:304), 2-hidroksi-2-metielsuksiensuur (sitramaliensuur) (Greter *et al.*, 1980:103, Kuhara *et al.*, 1982:102), metielsuksiensuur (Montgomery *et al.*, 1983:641), 3-hidroksi-isovaleriaansuur en 3-metielglutakonsuur (Kuhara *et al.*, 1982:104).

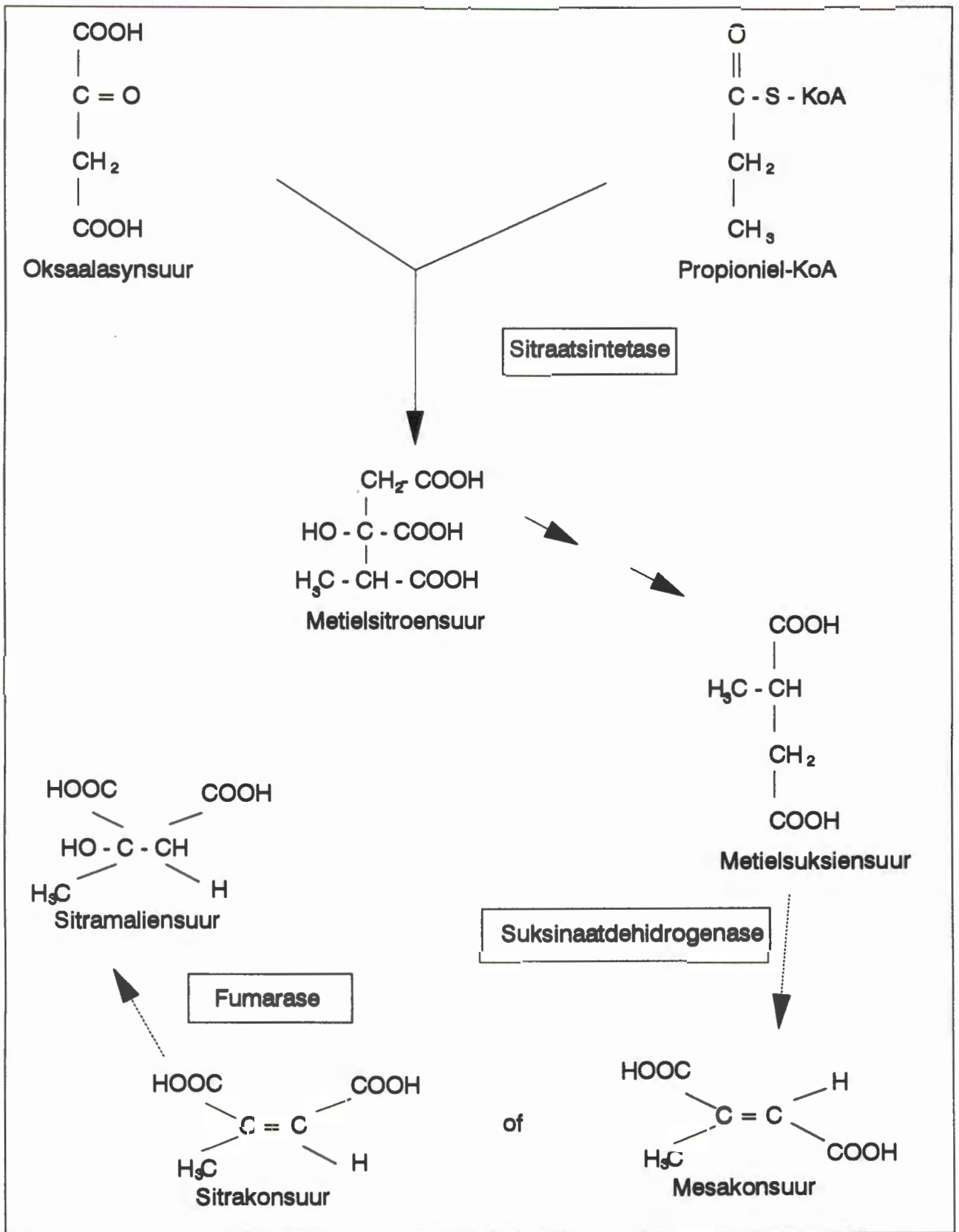
Hoewel bogenoemde kliniese en biochemiese simptome en tekens as tiperend van propioonasidemie beskou kan word, word aansienlike heterogeniteit met betrekking tot hierdie manifestasies gevind (Barshop *et al.*, 1991:15, Wendel, 1989:147, Wolf *et al.*, 1981:835, 838). Dit reflekteer waarskynlik baie verskille in totale genetiese samestelling, variasies in die propioniel-KoA-karboksilaseproteïen, verskille in die dieet en alternatiewe meganismes van propioonsuuropruiming (Rosenberg & Fenton, 1989:831).

2.3.3.4 Die oorsprong van metielsuksiensuur in propioonasidemie

Metielsuksiensuur word in propioonasidemie uit 2-metielbottersuur (Figuur 2.3), metionien en treonien (Figuur 2.3), gevorm (Mienie, 1994:172, 202). Greter en medewerkers (1980:105) het voorgestel dat sitramaliensuur uit metielsitroensuur deur die Krebs-siklus gevorm sou kon word (Figuur 2.4) maar het dit nie eksperimenteel bevestig nie (Greter *et al.*, 1980:105). Hierdie voorstelling impliseer dat metielsuksiensuur uit metielsitroensuur gevorm word (Figuur 2.4).



Figuur 2.3 Die anaboliese weë van metielsuksiensuur in propioonasidemie (Greter *et al.*, 1980:105, Mienie, 1994:172, 202).



Figuur 2.4 Die voorgestelde metaboliese weg van metielsuksiensuur deur die Krebs siklus (Greter *et al.*, 1980:105).

2.3.3.5 Die moontlike katabolisme van metielsuksiensuur in propioonasidemie

Greter en medewerkers (1980:105) het sitramaliensuur in die urien van pasiënte met propioonasidemie gevind en voorgestel dat dit van metielsitroensuur afkomstig kan wees. Volgens hierdie hipotese behoort metielsuksiensuur en mesakonsuur of sitrakonsuur as intermediêre van die reaksie gevorm te word. Dit impliseer dat metielsuksiensuur deur suksinaatdehidrogenase tot mesakonsuur omvorm word en dat laasgenoemde deur fumarase na sitramaliensuur omvorm word. Die voorgestelde weg van hierdie navorsers word in Figuur 2.4 getoon.

2.3.4 DIE MEERVOUDIGE ASIEL-KoA-DEHIDROGENASEDEFEKTE

2.3.4.1 Klassifikasie

Defekte in verskeie asiel-KoA-dehidrogenase-ensieme word as die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte beskryf. Die meervoudige-asiel-KoA-dehidrogenasedefekte word op grond van kliniese manifestering in drie groepe geklassifiseer, naamlik 'n ernstige variant (glutaarsuururie tipe II), wat in die neonatale periode met of sonder kongenitale anomalieë presenteer (groepe i en ii respektiewelik) en 'n laat aanvang (meestal) of milde tipe (etielmaloniel-adipiensuururie) (groep iii) (Yamaguchi *et al.*, 1991:63).

Glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie is klinies en biochemies verwante defekte (Amendt & Rhead, 1986:205). Die verskille tussen die twee toestande is in die kliniese ernstigheidsgraad en metabolietpatroon geleë (Mantagos *et al.*, 1979:1588) asook in die graad van ensiemdefektiwiteit (Rhead & Amendt, 1984:100).

Glutaarsuururie tipe II verskil van glutaarsuururie tipe I deurdat glutariel-KoA-dehidrogenase die enigste defektiewe ensiem in tipe I is, terwyl verskeie asiel-KoA-dehidrogenase-ensieme in tipe II defektief is (Gregersen, 1985:31-32).

'n Riboflavenresponsiewe variant van etielmaloniel-adipiensuururie is klinies gekarakteriseer en biochemies bevestig (Amendt & Rhead, 1986:205).

2.3.4.2 Ensiemdefek

Die genetiese defek in glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie is in die mitochondriale elektronoordragflavoproteïen (ETF) of ETF-dehidrogenase (ETF-ubikunoon-oksidoreduktase) geleë (Rinaldo *et al.*, 1991:216). Die fisiologiese rol van hierdie twee flavoproteïene is die opeenvolgende oordrag van elektrone vanaf mitochondriale FAD-afhanklike asiel-KoA-dehidrogenase-ensieme na koënsiem Q in die hoof-elektrontransportketting (Rinaldo *et al.*, 1991:216).

Verskeie stappe in die metabolisme van vetsure en aminosure word as gevolg van die defek belemmer (Rinaldo *et al.*, 1991:216). Die betrokke ensieme is die volgende: kort-, medium- en langkettingasiel-KoA-dehidrogenase, betrokke by β -oksidase van vetsure; isovaleriaan-KoA-dehidrogenase, isobutiriel-KoA-dehidrogenase en metielbutiriel-KoA-dehidrogenase, betrokke by die vertakteketting-aminosuurkatabolisme; glutariel-KoA-dehidrogenase, betrokke by die katabolisme van lisien, hidroksilisien en triptofaan en sarkosien-dehidrogenase (Yamaguchi *et al.*, 1991:60), 'n mitochondriale ensiem wat die oksidatiewe demetilering van sarkosien na glisien kataliseer (Goodman *et al.*, 1980:15).

Die kliniese en biochemiese diversiteit in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte blyk variërende defekte in ETF en ETF-dehidrogenase te reflekteer (Rhead *et al.*, 1987:371).

2.3.4.3 Kliniese beeld

Die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte is klinies 'n baie heterogene groep siektes (Rhead *et al.*, 1987:375). 'n Wye spektrum fenotipes word aangetref, wat wissel van episodes van hipoglukemie in andersins normale volwassenes, tot 'n skielike asidotiese koma in neonate met kongenitale afwykings (Colevas *et al.*, 1988:1133).

Neonatale glutaarsuururie tipe II

Hierdie variant word deur ernstige siekte in die neonatale periode, wat dikwels 'n snelle fatale verloop het, gekarakteriseer (Yamaguchi *et al.*, 1991:441). Vomering en letargie, wat in 'n asidotiese koma oorgaan is tiperend (Colevas *et al.*, 1988:1133, Mandel *et al.*, 1988:5). Hipotonie, tagipnee (Yamaguchi *et al.*, 1991:60) en hepatomegalie (Yamaguchi *et al.*, 1991:439) is ook algemene simptome. Die siekte kan ook deur 'n Reye-sindroomagtige patroon gekenmerk word (Yamaguchi *et al.*, 1991:60). Die kenmerkende 'sweetvoetrek' van isovaleriaanasidemiepatiënte kan ook in glutaarsuururie tipe II voorkom (Colevas *et al.*, 1988:1138).

Baie pasiënte met die neonatale tipe toon kongenitale anomalieë wat onder meer die volgende insluit: bilaterale polisistiese en displasiese niere; akkumulering van vet in die weefsels wat lipiede as primêre bron van energie gebruik, soos die lewer, hart en niere; pulmonêre hipoplasie, faciale dismorfisme, serebrale pagirrie en abnormaliteite van die eksterne genitalieë in manlike pasiënte (Colevas *et al.*, 1988:1133, 1137, Loehr *et al.*, 1990:311).

Milde glutaarsuururie tipe II (Etielmaloniel-adipiensuururie)

Die milde tipe presenteer in die neonatale periode, kinderjare of vroeë volwasse lewe (Bell *et al.*, 1990:1781). Sommige pasiënte het geen simptome gedurende die kinderjare nie en kan met episodiese siekte in die volwasse lewe presenteer (Yamaguchi *et al.*, 1991:63). Die kliniese simptome is milder en meer variërend as in die neonatale tipe (Rhead *et al.*, 1987:371). Pasiënte leef langer as dié met die neonatale tipe (Rhead *et al.*, 1987:371) en ondervind episodiese siekte-aanvalle soos hipotonie (Yamaguchi *et al.*, 1991:441) en koma (Rhead *et al.*, 1987:371). Soms kan Reye-sindroomagtige siekte (Yamaguchi *et al.*, 1991:441), 'n toestand wat deur serebrale en hepatiese disfunksie met vetinfiltrasie van die lewer, hipoglukemie, melksuur-asidose, hiperammonemie en dikarboksielsuururie gekenmerk word (Elpeleg *et al.*, 1990:709), in die infantiele fase of kinderjare voorkom. Die siekte mag selfs in hierdie stadiums of later met spierswakheid presenteer (Loehr *et al.*, 1990:311). Ontwikkelingsvertraging kan volgens Hoffmann *et*

al. (1990:337) voorkom. 'n Skerp reuk van die asem kan teenwoordig wees (Harpey *et al.*, 1987:882). Volgens Yamaguchi *et al.* (1991:63) het sommige pasiënte met die milde vorm onderbroke episodes van hipoglukemie of vomering.

Volwasse tipe

Volwasse pasiënte presenteer met 'n variërende beeld, wat met slegs hepatiese wanfunksie en vermoeidheid alleen geassosieer kan wees of met meer komplekse metaboliese versteurings, wat hipoglukemie en metaboliese asidose insluit (Bell *et al.*, 1990:1781). Siekte-aanvalle kom episodies voor (Dusheiko *et al.*, 1979:1405) en kan deur infeksies of ander strestoestande gepresipiteer word (Dusheiko *et al.*, 1979:1408, Henderson *et al.*, 1987:591). Naarheid, vomering en letargie kan ook met die episodes gepaard gaan (Dusheiko *et al.*, 1979:1405). Presentering met 'n Rey-sindroomagtige beeld blyk tipies van die volwasse glutaarsuururie tipe II te wees. Spierswakheid en herhaaldelike enkefalopatie kan ook voorkom (Bell *et al.*, 1990:1781).

2.3.4.4 Biochemiese beeld

Hipoketotiese hipoglukemie (Rhead *et al.*, 1987:371, Loehr *et al.*, 1990:311, Freneaux *et al.*, 1992:1679), metaboliese asidose (Hoffmann *et al.*, 1990:337, Yamaguchi *et al.*, 1991:439, Freneaux *et al.*, 1992:1679) en hiperammonemie (Colevas *et al.*, 1988:1133, Goodman & Greene, 1991:32, Levy *et al.*, 1993:26) is tiperend. Episodiese aanvalle hiervan kom in die milde variant voor.

Vetinfiltrasie van die lewer (Goodman *et al.*, 1980:12), niere, hart (Colevas *et al.*, 1988:1138) en spiere (Goodman *et al.*, 1980:13) (weefsels waar vetsure die primêre energiebron is) (Colevas *et al.*, 1988:1138) word algemeen gevind. Lipiedstoringsmiopatie wat met 'n karnitiengebreek gepaard gaan (Hoffmann *et al.*, 1990:337) is ook al gedokumenteer (Bell *et al.*, 1990:1779).

Hepatiëse wanfunksie is kenmerkend van die volwasse tipe (Bell *et al.*, 1990:1781). Die kliniese verloop gaan gepaard met hipoketotiese hipoglukemie en aansienlik verhoogde vryvetsuurvlakke sonder ketose (Dusheiko *et al.*, 1979:1405), asook metaboliese asidose (Bell *et al.*, 1990:1781), hepatiese wanfunksie, vetinfiltrasie van die lewer (Dusheiko *et al.*, 1979:1405:1408), proksimale lipiedstoringsmiopatie (Dusheiko *et al.*, 1979:1408) en hiperammonemie (Bell *et al.*, 1990:1781).

'n Sekondêre karnitiengebrek (Bell *et al.*, 1990:1779) kom voor. Verhoogde vlakke van geësterifiseerde karnitien in die plasma (Gregersen *et al.*, 1982:861) en urien is teenwoordig en word in 'n verhoogde asielkarnitien : vrye karnitienverhouding gereflekteer (Mandel *et al.*, 1988:401, Bell *et al.*, 1990:1780).

Erge pansitopenie, trombositopenie en anemie is deur Hoffmann *et al.* (1990:337-338) in die milde variant beskryf.

Urinêre organiese sure

Tussen die verskillende variante van die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte (Rinaldo *et al.*, 1991:216) sowel as binne dieselfde variantgroep (Green *et al.*, 1985:67) word groot variasies in die uitskeidingspatroon van metaboliete aangetref (Mantagos *et al.*, 1979:1588, Green *et al.*, 67-69).

Die ernstige variant word deur geweldige hoë konsentrasies glutaarsuur in die urien gekenmerk (Henderson *et al.*, 1987:589) wat tydens aanvalle sowel as kliniese stabiliteit teenwoordig is (Rinaldo *et al.*, 1991:218). Glutaarsuur is die predominerende urinêre metaboliet (Mantagos *et al.*, 1979:1588, Green *et al.*, 1985:67, Rinaldo *et al.*, 1991:216). 2-Hidroksiglutaarsuur is ook kenmerkend (Yamaguchi *et al.*, 1991:439) maar kom nie altyd voor nie en is soms in baie lae konsentrasies teenwoordig, terwyl glutaarsuur altyd hoog bly (Green *et al.*, 1985:67). 'n Wye spektrum van reguit- en vertakte-asiel-KoA-derivate (Rhead *et al.*, 1987:371), wat die ooreenstemmende metaboliete van die defektiewe stappe is (Yamaguchi *et al.*, 1991:60), word uitgeskei:

Kortkettingvetsure: isovaleriaansuur, isobottersuur, 2-metielbottersuur, bottersuur, heksanoësuur (Rhead *et al.*, 1987:371) en melksuur (Mooy *et al.*, 1984:94);

Dikarboksielsure: adipiensuur, suberiensuur en sebakiensuur (Yamaguchi *et al.*, 1990:782);

Glisienkonjugate van bogenoemde metaboliete (Rhead *et al.*, 1987:371) (behalwe melksuur) en

Karnitienkonjugate, soos heksanoëiel- en suberiëlkarnitien (Bell *et al.*, 1990:1781).

Etielmaloonsuur (Amendt & Rhead, 1986:205), metielsuksiensuur (Goodman *et al.*, 1980:12, Hoffmann *et al.*, 1990:337), 2-hidroksiglutaarsuur (Goodman *et al.*, 1980:12) en die aminosuur sarkosien (Goodman *et al.*, 1980:12) kan ook teenwoordig wees. Die voorkoms van 5-hidroksikaproësuur (Gregersen *et al.*, 1982:861), 5-hidroksiheksanoësuur (Loehr *et al.*, 1990:312) en kaproëielglisien (Gregersen *et al.*, 1982:861) is ook al beskryf.

Die variasies in die organiese suururie reflekteer moontlik verskille in dieetinnames van vet en proteïene (Goodman *et al.*, 1980:12).

Die uitskeidingspatroon van metaboliete in die milde variant van die defek is baie variërend (Green *et al.*, 1985:67-69, Rinaldo *et al.*, 1991:216) maar word deur verhoogde konsentrasies etielmaloonsuur, adipiensuur en heksanoëielglisien gedomineer (Mantagos *et al.*, 1979:1585-1586, Amendt & Rhead, 1986:205). Metielsuksiensuur word ook uitgeskei (Goodman *et al.*, 1980:12, Gregersen *et al.*, 1982:862, Yamaguchi *et al.*, 1991:439) en wel as 'n konstante hoeveelheid van 10 % van die konsentrasie van etielmaloonsuur (Mantagos *et al.*, 1979:1588). Variërende hoeveelhede adipiensuur word uitgeskei (Rhead *et al.*, 1987:371). Glutaarsuur kom in klein hoeveelhede voor of is afwesig. Klein hoeveelhede suberiensuur, sebakiensuur en dekedioënsuur kan ook teenwoordig wees. Groot hoeveelhede heksanoësuur en slegs matig verhoogde konsentrasies van die karakteristieke kortkettingvetsure word uitgeskei. Hiperglisienurie kom soms voor (Mantagos *et al.*, 1979:1580-1582).

Pasiënte met die milde variant toon onder toestande van fisiologiese stres, ernstige siekte, kataboliese toestande en/of belading met voorlopers 'n soortgelyke metabolietpatroon as dié met die ernstige variant (Amendt & Rhead, 1986:205). Glutaarsuur is

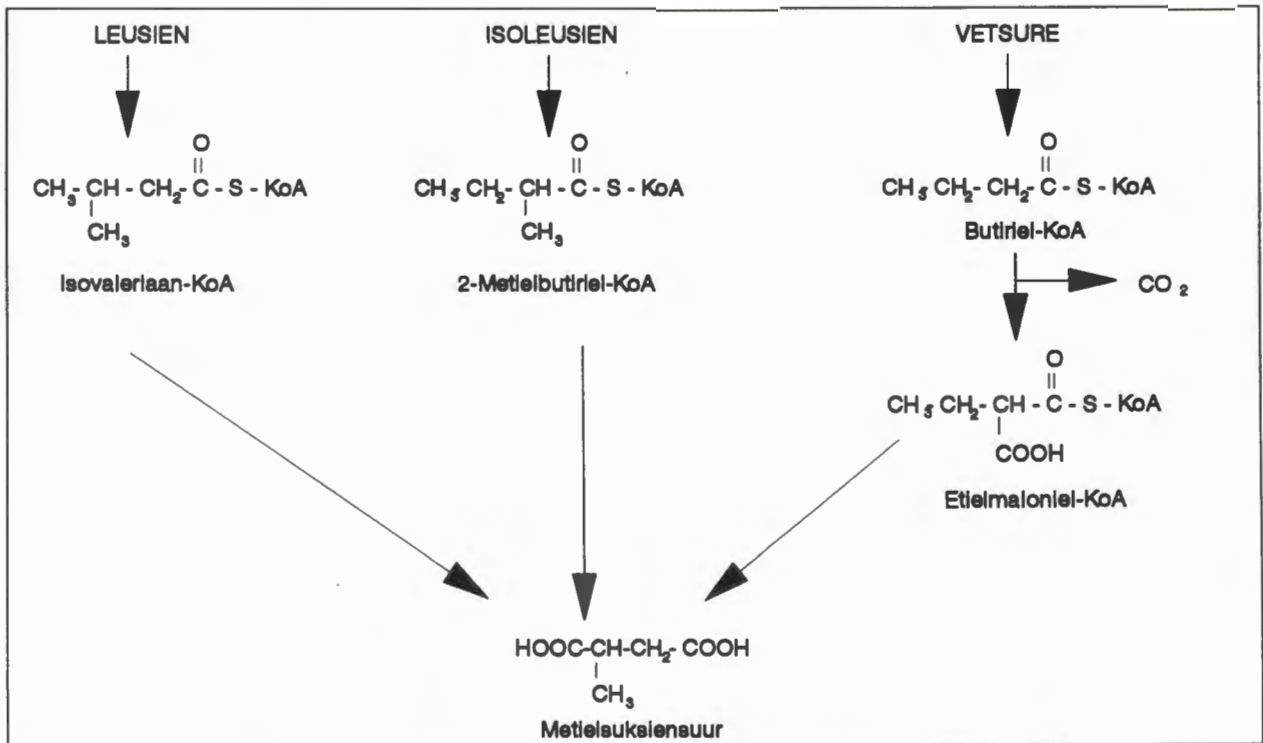
ook onder hierdie toestande prominent en 'n hoër uitskeiding van dikarboksielsure as tydens remissie word gevind (Green *et al.*, 1985:67).

Die riboflavenresponsiewe variant van etielmaloniel-adipienuururie word deur 'n C₆-C₁₀ dikarboksielsuururie gekenmerk (Gregersen *et al.*, 1982:861, 864).

2.3.4.5 Die oorsprong van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte

Die geïnduseerde metaboliese weë vir die vorming van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte word in Figuur 2.5 weergegee. Drie weë is hier betrokke (Goodman *et al.*, 1980:15), naamlik:

1. Katabolisme van isoleusien via 2-metielbottersuur (Burlina *et al.*, 1991:1523);
2. katabolisme van leusien via 4-hidroksi-isovaleriaansuur en
3. katabolisme van vetsure via butiriël-KoA en etielmaloniel-KoA.



Figuur 2.5 Die anaboliese weë van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte (Goodman *et al.*, 1980:15).

2.3.4.6 Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte beïnvloed

Sommige publikasies het slegs aangedui of metielsuksiensuur by 'n pasiënt teenwoordig was of nie, terwyl ander outeurs meer van die kliniese verloop en die verband daarvan met die uitskeiding van metielsuksiensuur vermeld het.

Uit die literatuur blyk dit dat hiperammonemie, hipoglukemie en asidose (sonder ketose) by die meeste pasiënte met glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie voorgekom het, terwyl metielsuksiensuur in sommige van hierdie pasiënte teenwoordig en in ander afwesig was.

Vir die doel van hierdie bespreking is die pasiënte waaroor daar in die literatuur gedokumenteer is in drie groepe verdeel. Die eerste groep pasiënte sluit publikasies in aangaande die teenwoordigheid (groep 1a) of afwesigheid (groep 1b) van metielsuksiensuur, sonder dat daar iets oor die kliniese verloop en die verband daarvan met die uitskeiding van metielsuksiensuur vermeld is. Die tweede groep pasiënte het metielsuksiensuur onder toestande van remissie uitgeskei of wanneer die kliniese toestand begin verbeter het, of die konsentrasies van metielsuksiensuur was hoër as tydens die akute fase van die aanval. Die derde groep pasiënte het 'n reglynige verband tussen die kliniese ernstighedsgraad en die uitskeiding van metielsuksiensuur getoon. Elk van hierdie groepe pasiënte sal vervolgens kortliks bespreek word.

Groep 1

Die publikasies oor pasiënte in hierdie groep het slegs aangedui of metielsuksiensuur in die urien teenwoordig was of nie. Die volgende afleidings kan aangaande hierdie pasiënte gemaak word: Eerstens, ten opsigte van die pasiënte wat geen meetbare hoeveelhede metielsuksiensuur uitgeskei het nie (groep 1a), bestaan die volgende moontlikhede ten opsigte van hierdie studie:

- (a) Baie lae konsentrasies van die verbinding is gevorm sodat dit nie waargeneem word nie. 'n Spesifieke isomeer sou moontlik hier ter sprake kon wees;
- (b) metielsuksiensuur is nie op die tydstip van monsterneming uitgeskei nie, omdat die kliniese toestand in sodanige ernstige fase was dat die sel dit teruggehou het (vergeelyk 2.3.2.6). Hierdie verskynsel dat die sel metaboliete tydens ernstige kliniese onstabieleit terughou is ook vir metielsitroensuur in propioonasidemie gevind (Tavares de Almeida *et al.*, 1991:261, Van Rooyen, 1994:102).

Tweedens kan die volgende afleidings ten opsigte van die pasiënte wat metielsuksiensuur op die tydstip van monsterneming uitgeskei het (groep 1b), gemaak word:

- (a) Die pasiënte het 'n ander isomeer van metielsuksiensuur as die bogenoemde groep pasiënte gevorm en
- (b) die kliniese toestand op die tydstip van monsterneming was nie so ernstig dat die sel dit teruggehou het nie.

Groep 2

By die pasiënte wat deur Gregersen *et al.* (1982:864) bestudeer is het metielsuksiensuur eers onder toestande van remissie verskyn of wanneer die kliniese toestand begin verbeter het. Hierdie groep pasiënte sluit ook dié in wat hoër konsentrasies metielsuksiensuur onder toestande van kliniese beterskap uitgeskei het (Mantagos *et al.*, 1979:1583).

Tabel 2.3 toon die konsentrasies van metielsuksiensuur in 'n glutaarsuururie tipe II-pasiënt tydens 'n aanval en onder toestande van metaboliese beheer. Laasgenoemde toestand is deur geringe metaboliese asidose met ketose gekarakteriseer (Gregersen *et al.*, 1982:864). Die konsentrasies van metielsuksiensuur was aansienlik laer tydens die aanval (8 mmol/mol kreatinien) as onder toestande van metaboliese beheer (32 tot 45 mmol/mol kreatinien) (Gregersen *et al.*, 1982:862-864).

Tabel 2.4 toon die konsentrasies van metielsuksiensuur tydens die eerste ses dae van hospitalisasie in 'n etielmaloniel-adipiensuururiepatiënt (Mantagos *et al.*, 1979:1583). Die konsentrasies van metielsuksiensuur het tydens hierdie tydperk aansienlik gevarieer, met die hoogste uitskeiding op die sesde dag van hospitalisasie, waarop die pasiënt moontlik die beste kliniese toestand van die ses dae getoon het.

Tabel 2.3 Konsentrasies van metielsuksiensuur (mmol/mol kreatinien) in die urien van 'n glutaarsuururie tipe II-pasiënt tydens 'n aanval en onder toestande van metaboliese beheer (Gregersen *et al.*, 1982:862).

	Tydens aanval	Onder metaboliese beheer		Kontrole
Metielsuksiensuur	8	32	45	2 - 3

Tabel 2.4 Konsentrasies van metielsuksiensuur (mmol/mol kreatinien) in die urien van 'n etielmaloniel-adipiensuururiepatiënt tydens hospitalisasie (Mantagos *et al.*, 1979:1583).

Dae van hospitalisasie	1	2	3	4	5	6	Kontrole
Metielsuksiensuur	40	11	4	33	31	48	2

Volgens Hoffmann *et al.* (1990:338) verhoog die etielmaloonsuuruitskeiding tydens 'n 24-uur vasperiode en verminder weer later in die vasperiode. Die hoër vlakke van etielmaloonsuur gaan ook met simptomatiesse hipoglukemie en ketoasidose gepaard.

Groep 3

Die pasiënt wat deur Rinaldo *et al.* (1991:218) beskryf is se metielsuksiensuuruitskeiding het in teenstelling met die vorige pasiënte, 'n reglynige verband met die kliniese verloop getoon. Die pasiënt het nie metielsuksiensuur uitgeskei wanneer hy klinies wel was nie, maar tydens milde sowel as akute simptome. In laasgenoemde geval was die metielsuksiensuurkonsentrasies die hoogste van die drie fases. Hierdie outeurs het nie die waardes van metielsuksiensuur gedokumenteer nie maar slegs grafieke van die

piekhoogtes van die verbinding aangetoon. Die anderse patroon van metielsuksien-suuruitskeiding by hierdie pasiënt in vergelyking met die ander publikasies, kan moontlik aan die volgende toegeskryf word:

- (a) Die kliniese toestand was nie so erg dat die sel die verbinding teruggehou het nie en
- (b) dit mag moontlik wees dat die pasiënt nog net in 'n voorloperfase tot 'n ernstiger kliniese siekte was, met ander woorde sou die pasiënt nog sieker word sou dieselfde patroon as in groep 2 gesien kon word. Verder kan 'n reglynige verband moontlik nog in 'n minder ernstige kliniese dekompensasiefase gesien word, wat hier die geval sou kon wees.

Samevattend dus, word die uitskeiding van metielsuksiensuur moontlik deur die volgende faktore beïnvloed:

- (a) Die graad van kliniese siekte;
- (b) of die L- of D-isomeer van metielsuksiensuur gevorm word. Minder van een van die isomere word moontlik gevorm en gevolglik nie waargeneem nie. Omdat die D-isomeer as 'n inhibeerder van suksinaatdehidrogenase kan optree mag dit ernstigste kliniese gevolge hê. Wanneer die L-isomeer gevorm word, kom daar moontlik minder ernstige kliniese simptome voor as wanneer die D-isomeer gevorm word en
- (c) onder toestande van ernstige kliniese siekte mag die sel metielsuksiensuur terughou.

Die verwantskap tussen die uitskeiding van metielsuksiensuur en hipoglukemie, metaboliese asidose en hiperammonemie

Die uitskeiding en konsentrasies van metielsuksiensuur het geen verband met die glukosevlakke of die voorkoms van hipoglukemie getoon nie. Die pasiënt van Gregersen *et al.* (1982:862-863) (Tabel 2.5 en 2.6) en Dusheiko *et al.* (1979:1406-1407) (Tabel 2.7) het baie hoë konsentrasies metielsuksiensuur uitgeskei, terwyl die glukosevlakke normaal

was. Die metielsuksiensuurkonsentrasies van Dusheiko *et al.* (1979:1406-1407) se pasiënt het gedurende 'n hipoglukemiese koma en normoglukemiese periodes heelwat gevarieer (Tabel 2.7).

Tabel 2.5 Die konsentrasies van metielsuksiensuur en die plasmaglukose tydens 'n aanval en onder toestande van metaboliese beheer in 'n glutaarsuururie tipe II-pasiënt (Gregersen *et al.*, 1982:862-863).

	Tydens aanval	Onder metaboliese beheer		Kontrole
Metielsuksien- suur (mmol/mol kreatinien)	8	32	45	2 - 3
Plasmaglukose (mmol/L)	4.4 3.3 1.7	4.4	4.1	3.3 - 5.6

Die pasient van Mooy *et al.* (1984:93-94) het geen metielsuksiensuur uitgeskei nie en was hipoglukemies. Die pasiënte van Henderson *et al.* (1987:589-590) en Rhead *et al.* (1987:371, 373) het wel metielsuksiensuur uitgeskei en was ook hipoglukemies. Verskeie ander pasiënte wat hipoglukemies was het nie metielsuksiensuur uitgeskei nie.

Burlina *et al.* (1991:1523) het 'n pasiënt beskryf wat 'n twee- tot vyfvoudig verhoogde konsentrasie metielsuksiensuur uitgeskei het, terwyl die glukosevlakke normaal was.

Daar kon geen verband tussen metaboliese asidose en die uitskeiding van metielsuksiensuur uit die literatuur gevind word nie. Geen verband tussen die konsentrasies van 3-hidroksibottersuur en metielsuksiensuur het in die studies van Gregersen (1982:862-863) en Dusheiko *et al.* (1979:1406-1407) voorgekom nie (Tabel 2.6 en 2.7). Die pasient van Mooy *et al.* (1984:93-94) het geen metielsuksiensuur uitgeskei nie en was nie asidoties nie, terwyl die pasiente van Henderson *et al.* (1987:589-590) en Rhead *et al.* (1987:371,373) metielsuksiensuur uitgeskei het en wel asidoties was.

Die ammoniumvlakke in Gregersen *et al.* (1982:862,863) se pasiënt het tydens die aanval verhoog, waartydens metaboliese asidose ontwikkel en die bloedglukosevlakke gedaal het. Die konsentrasies van metielsuksiensuur het gelyktydig hiemees gedaal (Gregersen *et al.*, 1982:862-864). Dit is nie duidelik of daar moontlik 'n verband tussen hiperammonemie en die uitskeiding van metielsuksiensuur sou kon bestaan nie. Verskeie pasiënte waarby hiperammonemie teenwoordig was, het geen metielsuksiensuur uitgeskei nie.

Burlina *et al.* (1991:1523) se pasiënt het 'n twee- tot vyfvoudig verhoogde konsentrasie metielsuksiensuur uitgeskei, terwyl die ammoniumvlakke normaal was.

Uit Tabel 2.6 wil dit egter voorkom of die konsentrasies van 3-hidroksi-isovaleriaansuur dieselfde uitskeidingspatroon as metielsuksiensuur volg.

Yamaguchi *et al.* (1991:440-442) het 'n baba beskryf wat vanaf geboorte tot op vyf maande metielsuksiensuurkonsentrasies wat van 2.53 tot 25.01 mmol/mol kreatinien gewissel het, uitgeskei het. Hierdie baba het geen kliniese siektesimptome tot in die vroeë infantiele periode getoon nie.

Tabel 2.6 Die konsentrasies van metielsuksiensuur, 3-hidroksi-isovaleriaansuur, 3-hidroksibottersuur, plasmaglukose en plasma-ammonium in 'n glutaarsuururie tipe II-pasiënt tydens 'n aanval en onder toestande van metaboliese beheer (Gregersen *et al.*, 1982:862-863).

	Tydens aanval	Onder metaboliese beheer		Kontrole	Terugval
Metielsuksien-suur (mmol/mol kreatinien)	8	32	45	2 - 3	
3-Hidroksi-isovaleriaan-suur (mmol/mol kreatinien)	38	76	85	10 - 13	

3-Hidroksi-bottersuur (mmol/mol kreatinien)	475	173	690	70 - 120	
Plasmaglukose (mmol/L)	4.4 3.3 1.7	4.4	4.1	3.3 - 5.6	3.3 - 5.0
Plasma-ammonium (mmol/L)	7.5			12 - 76	

Tabel 2.7 Die konsentrasies van metielsuksiensuur, glukose, asetoasynsuur en 3-hidroksi-bottersuur tydens 'n hipoglukemiese koma en normoglukemiese toestande in 'n volwasse glutaarsuururie tipe II-pasiënt (Dusheiko *et al.*, 1979:1406-1407).

	Metielsuksien-suur (mmol/mol kreatinien)	Glukose (mg/100 ml)	Asetoasynsuur (mg/100 ml)	3-Hidroksi-bottersuur (mg/100 ml)
Hipoglukemiese koma	35 192	28 25	0.35	0.53
Normoglukemie	44			
Remissie	30	134	0.32	0.81
Kontrole	2 - 3	60 - 110	0.15 - 0.8	0.6 - 1.73

2.3.5 MEDIUMKETTINGASIEL-KoA-DEHIDROGENASEDEFEK (MCAD)

2.3.5.1 Ensiemdefek

Die defektiewe ensiem in hierdie siektetoestand is mediumkettingasiel-KoA-dehidrogenase (MCAD) (Gregersen *et al.*, 1993:342) wat vir β -oksidase van vetsure met mediumkettinglengtes (ses tot twaalf koolstofatome) verantwoordelik is. Die primêre gevolg van die defek onder kataboliese toestande is akkumulering van mediumketting-

asiel-KoA-intermediêre in die mitochondria, wat onvoldoende produksie van asetiel-KoA tot gevolg het (Taubman *et al.*, 1987:383).

2.3.5.2 Kliniese beeld

MCAD is die mees algemene genetiese defek in die β -oksidasieweg van vetsure (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:332). Daar is geen tipiese kliniese patroon nie maar wel 'n aantal algemene kenmerke (Roe & Coates, 1989:898). Die meeste kinders presenteer tussen die ouderdomme van vier maande en vier jaar (Wilcken *et al.*, 1993:292). Episodes van letargie en vomering na 'n vasperiode is kenmerkend. Laasgenoemde ontstaan dikwels wanneer die baba 'n verminderde energie-inname of verhoogde - behoefte as gevolg van kataboliese toestande (Taubman *et al.*, 1987:383, Perper & Ahdab-Barmada, 1992:333), soos infeksies ondervind (Wilcken *et al.*, 1993:292). Die toestand kan tot 'n koma ontwikkel wat fataal kan wees (Gregersen *et al.*, 1993:343). Konvulsies en hepatomegalie kan saam met die eersgenoemde simptome voorkom (Touma & Charpentier, 1992:142). Die kliniese beeld is baie ooreenstemmend met dié van Reye se sindroom (Taubman *et al.*, 1987:382).

Defekte van vetsuuroksidasie mag tot 'n betreklik laat stadium van 'n vastestand klinies ongemerk bly, omdat hierdie weg nie 'n prominente rol in energieproduksie tydens nie-vastende toestande speel nie (Nyhan, 1988:1345). Pasiënte met MCAD-defek is daarom dikwels asimptomaties tussen kliniese episodes (Wilcken *et al.*, 1993:292).

2.3.5.3 Biochemiese beeld

Die volgende biochemiese kenmerke word in MCAD gevind: hipoketotiese hipoglukemie (Touma & Charpentier, 1992:142, Perper & Ahdab-Barmada, 1992:333, Wilcken *et al.*, 1993:292), metaboliese asidose (Vianey-Liaud *et al.*, 1987:169, Egidio *et al.*, 1989:224, Touma & Charpentier, 1992:142), hiperammonemie (Taubman *et al.*, 1987:383, Touma & Charpentier, 1992:143, Wilcken *et al.*, 1993:292), verhoogde vryvetsuurvlakke (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:332, Touma & Charpentier, 1992:143) en vetinfiltrasie van hepatosiete (Vianey-Liaud *et al.*, 1987:169). Verhoogde plasma-

lewerensiemaktiwiteit en verhoogde ureum- en uriensuurvlakke word ook gevind (Wilcken *et al.*, 1993:292).

Vet akkumuleer gedurende episodes van lipolise in die lewer. Hoë vlakke sirkulerende vrye vetsure is in die plasma teenwoordig met ontoepaslik lae vlakke van ketoonlygame. Ketose is afwesig as gevolg van inkorting van die ketogeneseweg (Touma & Charpentier, 1992:143) weens onvoldoende vlakke van asetiel-KoA (Taubman, 1987:383), wat 'n direkte gevolg van die defektiewe dehidrogenase-ensiem is.

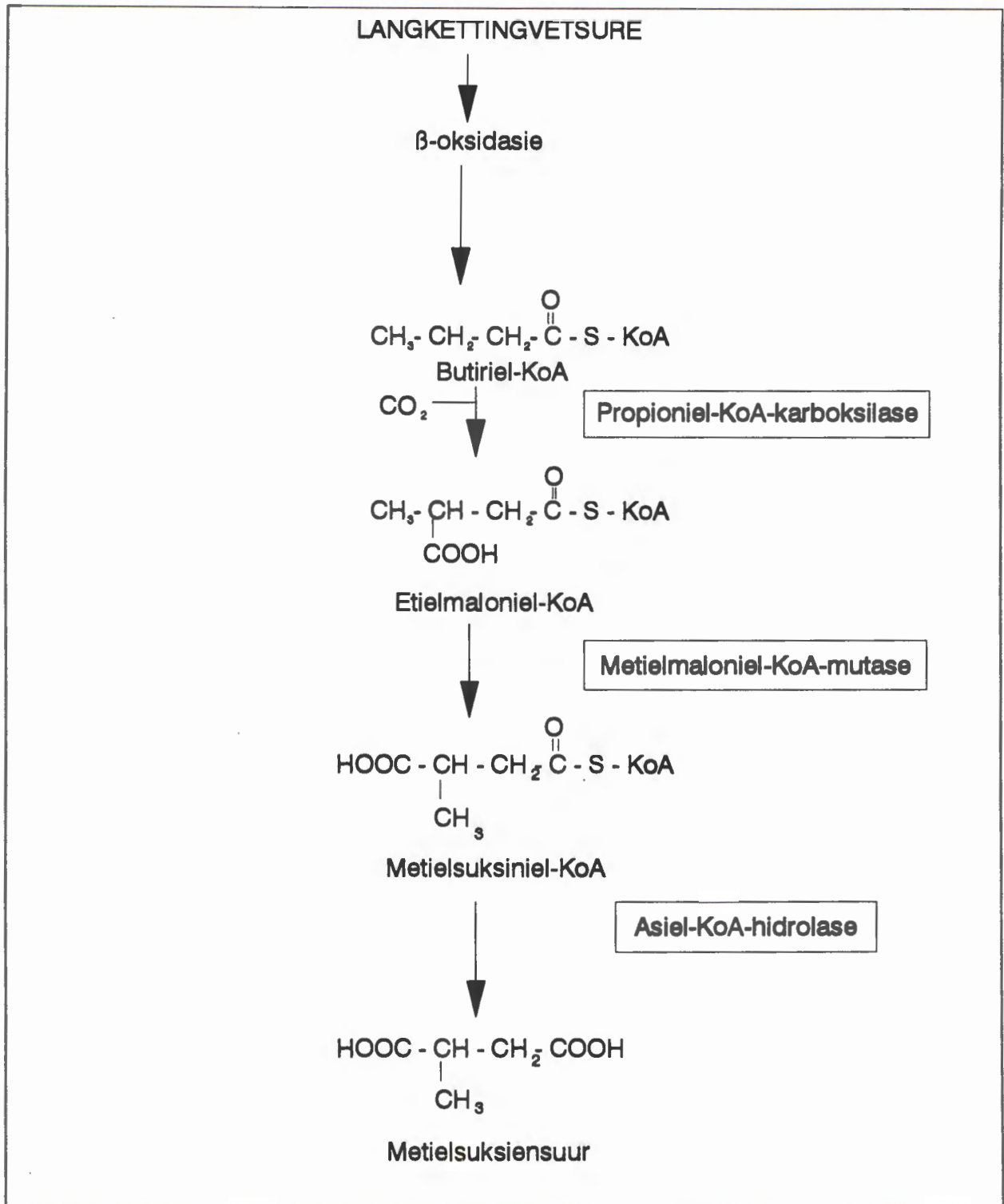
In die algemeen word 'n sekondêre karnitiengebreek ondervind (Taubman *et al.*, 1987:384). Plasma- totale en -vrye karnitienvlakke is in die meeste gevalle verlaag. Lae karnitienvlakke word ook in die skeletspiere en lewer aangetref met 'n verhoogde hoeveelheid geësterifiseerde karnitien (Touma & Charpentier, 1992:143).

Urinêre organiese sure

Verhoogde urinêre uitskeiding van mediumkettingvetsuurmetaboliete is kenmerkend (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:331). Dit sluit die mediumketting-dikarboksielsure (Wilcken *et al.*, 1993:292) adipiensuur, suberiensuur en sebakiensuur (Vianey-Liaud *et al.*, 1987:169); en metielsuksiensuur (Gregersen *et al.*, 1983:186); glisienkonjugate (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:331, Touma & Charpentier, 1992:142) (heksanoïel-, fenielpropioniel-, en suberielglisien (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:333)) en karnitienesters (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:331, Schmidt-Sommerfeld *et al.*, 1992:549), veral oktanoïelkarnitien (Pollit, 1989:217), in. 5-Hidroksiheksanoësuur (Touma & Charpentier, 1992:143) en 7-hidroksi-oktanoësuur (Pitt, 1993:396) kom ook urinêr voor.

2.3.5.4 Die oorsprong van metielsuksiensuur in MCAD

Metielsuksiensuur word deur die metaboliese weg van butiriel-KoA via etielmaloniel-KoA gevorm (Gregersen, 1985:33), soos in Figuur 2.6 aangetoon word.



Figuur 2.6 Die anaboliese weg van metielsuksiensuur is MCAD en SCAD (Gregersen, 1985:33, Vianey-Liaud *et al.*, 1987:182, Sewell *et al.*, 1993:924).

2.3.5.5 Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in MCAD beïnvloed

Die voorkoms van metielsuksiensuur is in sommige MCAD-pasiënte gedokumenteer.

Gregersen *et al.*, (1983:181-186) het drie pasiënte tydens kliniese aanvalle en remissie bestudeer. Die eerste pasiënt het verhoogde konsentrasies metielsuksiensuur uitgeskei toe hy klinies wel was (9 mmol/mol kreatinien). Hierdie pasiënt, wat gesterf het, het ook tydens die aanval 'n verhoogde konsentrasie metielsuksiensuur uitgeskei (5 mmol/mol kreatinien) (Tabel 2.8).

Die tweede pasiënt het verhoogde konsentrasies metielsuksiensuur tydens een van die aanvalle uitgeskei (5 mmol/mol kreatinien), terwyl die konsentrasies daarvan tydens die ander aanval sowel as met kliniese stabiliteit, 3 mmol/mol kreatinien was (normaal 2 - 3 mmol/mol kreatinien) (Tabel 2.8) (Gregersen *et al.*, 1983:186).

Die derde pasiënt het 3 mmol/mol kreatinien tydens die aanval sowel as tydens remissie uitgeskei (Tabel 2.8) (Gregersen *et al.*, 1983:186).

Laasgenoemde twee pasiënte het nie gesterf nie en hulle het laer metielsuksiensuur-konsentrasies as die eerste pasiënt uitgeskei. Dit lyk egter nie of die kliniese verloop van hierdie pasiënte veel van dié van die eerste pasiënt verskil het nie. By die tweede pasiënt was metaboliese asidose teenwoordig, wat nie by die ander twee pasiënte gerapporteer is nie (Gregersen *et al.*, 1983:182-183). Al drie pasiënte was hipoglukemies (Gregersen *et al.*, 1976:418, Gregersen *et al.*, 1983:183).

Die vraag kan gevra word of die uitskeiding van 'n hoër konsentrasie metielsuksiensuur met die sterfte van die eerste pasiënt verband hou. Indien dit met die SCAD-pasiënt van Amendt *et al.* (1987:1303-1305) vergelyk word, waar die pasiënt gesterf het en geen metielsuksiensuur uitgeskei nie (sien 2.3.6.5), blyk daar nie 'n verband te wees nie.

Tabel 2.8 Die konsentrasies van metielsuksiensuur en 3-hidroksi-bottersuur (in mmol/mol kreatinien) in die urien van drie MCAD-pasiënte (Gregersen *et al.*, 1983:186).

	Pasiënt 1				Pasiënt 2			Pasiënt 3	
MS	9	9	9	5	5	3	3	3	3
3-HB	326	3100	239	196	370	104	30	1050	45

MS = Metielsuksiensuur

3-HB = 3-Hidroksibottersuur

2.3.6 KORTKETINGASIEL-KoA-DEHIDROGENASEDEFEK (SCAD)

2.3.6.1 Ensiemdefek

SCAD word met 'n defek van kortkettingasiel-KoA-dehidrogenase (butiriel-KoA-dehidrogenase), wat vetsure met vier tot ses koolstowwe oksideer, geassosieer (Amendt *et al.*, 1987:1303).

2.3.6.2 Kliniese beeld

SCAD presenteer met variërende simptome en is al in babas (Amendt *et al.*, 1992:552, Sewell *et al.*, 1993:922) en middeljarige persone (Turnbull *et al.*, 1984:1232) beskryf. Min gevalle is tot dusver gedokumenteer en die kliniese beeld is nog nie duidelik gedefinieer nie (Sewell *et al.*, 1993:922).

Die simptome in babas blyk egter die volgende in te sluit: progressiewe spierswakheid (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:333) en erge hipotonie, vasintoleransie (Sewell *et al.*, 1993:923), ontwikkelingsvertraging (Coates *et al.*, 1988:172), mikrosefalie en 'n mate van verstandelike vertraging (Vianey-Liaud *et al.*, 1987:178).

Spierswakheid (Amendt *et al.*, 1992:552) as gevolg van lipiedstoringsmiopatie (Turnbull *et al.*, 1987:109) en intoleransie van oefening (Turnbull *et al.*, 1984:1233, Vianey-Liaud *et al.*, 1987:178) blyk met volwasse gevalle geassosieer te wees.

2.3.6.3 Biochemiese beeld

Die ergste vorm van die defek word volgens Wood *et al.* (1989:38) deur episodes van metaboliese asidose (Perper & Ahdab-Barmada, 1992:333, Amendt *et al.*, 1992:552) en nie-ketotiese hipoglukemie gekenmerk (Wood *et al.*, 1989:38). Hipoglukemie is egter dikwels afwesig (Vianey-Liaud *et al.*, 1987:178, Roe & Coates, 1989:910, Sewell *et al.*, 1993:923). Hiperammonemie is ook gevind (Amendt *et al.*, 1987:1307, Burton, 1987:362, Perper & Ahdab-Barmada, 1992:333).

Pasiënte ondervind 'n erge spierkarnitiengebreek wat waarskynlik met die hipotonie verband hou. Vetdeponering vind in die lewer (Amendt *et al.*, 1992:555) en spiere (Roe & Coates, 1989:889) plaas. Lipiedstoringsmiopatie is in 'n volwasse pasiënt aangetoon (Turnbull *et al.*, 1984:1232-1233).

Urinêre organiese sure

Die diagnostiese urinêre organiese sure is bottersuur, adipiensuur, etielmaloonsuur (Roe & Coates, 1989:910), metielsuksiensuur (Turnbull *et al.*, 1984:1233, Vianey-Liaud *et al.*, 1987:179, Amendt *et al.*, 1987:1303, Wood *et al.*, 1989:40, Sewell *et al.*, 1993:922) en butiriëlgliëien (Vianey-Liaud *et al.*, 1987:179).

2.3.6.4 Die oorsprong van metielsuksiensuur in SCAD

Metielsuksiensuur word in SCAD-pasiënte deur dieselfde weg as in die gevalle van etielmaloniël-adipiensuururie en MCAD (Figuur 2.6) gevorm (Vianey-Liaud *et al.*, 1987:182, Sewell *et al.*, 1993:924).

2.3.6.5 Faktore wat die uitskeiding van metielsuksiensuur in SCAD beïnvloed

Amendt *et al.* (1987:1303-1305) het twee SCAD-pasiënte beskryf waarvan die kliniese beelde grootliks verskil het.

Die eerste pasiënt het hoë konsentrasies metielsuksiensuur tydens die aanval, wat metaboliese asidose ingesluit het, uitgeskei. Toe die kliniese toestand begin verbeter het, het die metielsuksiensuurkonsentrasies baie hoog gestyg. Geen asidose was tydens die verbetering teenwoordig nie (Amendt *et al.*, 1987:1304).

Die tweede pasiënt met SCAD het 'n baie ernstiger kliniese verloop met fatale metaboliese asidose getoon. Hierdie pasiënt het gesterf sonder die voorkoms van verhoogde metielsuksiensuuruitskeiding (Amendt *et al.*, 1987:1305, 1307).

In die lig van die voorafgaande kan die moontlikheid oorweeg word dat die eerste pasiënt nie asidoties genoeg was om metielsuksiensuur terug te hou nie (vergelyk 2.3.4.6).

Sewell *et al.* (1993:922-924) het 'n pasiënt beskryf wat slegs onder strestoestande verhoogde konsentrasies metielsuksiensuur uitgeskei het. Die outeurs het verder aangedui dat verhoogde metielsuksiensuurkonsentrasies onder vasttoestande en hipoglukemie voorgekom het. Tabel 2.9 toon die verband tussen die metielsuksiensuurkonsentrasies en hipoglukemie in hierdie pasiënt. Hiervolgens lyk dit of daar, in teenstelling met die vorige gevalle (2.3.4.6 en 2.3.6.5), 'n verband tussen hipoglukemie en die uitskeiding van metielsuksiensuur bestaan (Sewell *et al.*, 1993:922-924).

Turnbull *et al.* (1984:1233) het 'n volwasse pasiënt beskryf wat met oefening erge asidose ontwikkel en verhoogde konsentrasies metielsuksiensuur uitgeskei het (15 mmol/mol kreatinien).

Tabel 2.9 Die verband tussen die konsentrasies van metielsuksiensuur en hipoglukemie in 'n SCAD-pasiënt (Sewell *et al.*, 1993:923).

Metielsuksiensuur (mmol/mol kreatinien)	
Opname	Nie meetbaar nie
Hipoglukemiese fase	22.4
6h-Posthipoglukemie	8.8
Kontrole	0.3 - 1.7

2.3.6.6 Moontlike katabolisme van metielsuksiensuur in die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte, MCAD en SCAD

Soos in die geval van isovaleriaanasidemie, is dit moontlik dat metielsuksiensuur tot metielfumaarsuur gekataboliseer kan word. Die voorkoms van metielfumaarsuur is egter nog nie by hierdie defekte gedokumenteer nie. Die volgende verklarings kan daarvoor gebied word:

1. Omdat die konsentrasies van metielsuksiensuur in isovaleriaanasidemiepatiënte heelwat hoër as in die geval van die meervoudige asiel-KoA-dehidrogenasedefekte, MCAD en SCAD is, word daar ook minder metielfumaarsuur gevorm. Dit word waarskynlik weer vinnig gemetaboliseer sodat dit nie waargeneem word nie.
2. Indien die metielsuksiensuur wat in hierdie pasiënte geproduseer word in die D-vorm sou wees, sou dit nie deur suksinaatdehidrogenase tot metielfumaarsuur afbreek kon word nie, aangesien D-metielsuksiensuur suksinaatdehidrogenase inhibeer (Veeger *et al.*, 1969:90).

Die moontlikheid is natuurlik nie uitgesluit dat beide isomere gevorm word nie, in welke geval moontlik slegs die L-isomeer verder gemetaboliseer sal word.

2.4 SAMEVATTING

Uit die voorafgaande gevallestudies is dit duidelik dat daar baie teenstrydige bevindings rondom die verband tussen die uitskeiding van metielsuksiensuur en die kliniese toestand van pasiënte bestaan. Nieteenstaande hierdie bevindings kan die volgende gevolgtrekkings of afleidings as verklarings hiervoor oorweeg word:

Die graad van kliniese siekte hou moontlik met die uitskeiding van metielsuksiensuur verband en die isomere wat gevorm word, sou moontlik die kliniese toestand kon bepaal. Onder toestande van ernstige kliniese siekte is die D-isomeer moontlik teenwoordig, wat weens die inhibisie wat dit uitoefen, vir sommige van die ernstige simptome verantwoordelik mag wees. Wanneer die L-isomeer gevorm word is minder ernstige

simptome moontlik teenwoordig as wanneer die D-isomeer gevorm word aangesien L-metielsuksiensuur verder gekataboliseer kan word (Veeger *et al.*, 1969:90).

2.5 AANGEBORE METABOLIESE DEFEKTE WAARBY METIELSUKSIENSUUR POTENSIEEL KAN GEVORM WORD

Die defekte wat onder 2.5 bespreek word is nie vir die voorkoms van metielsuksiensuur ondersoek nie. Die verbinding mag egter wel deur hierdie pasiënte gevorm word op grond van aard van die ensiemdefekte en die anaboliese weë van metielsuksiensuur wat reeds in hierdie hoofstuk vermeld is.

2.5.1 GEÏSOLEERDE METIELKROTONIEL-KoA-KARBOKSILASEDEFEK

2.5.1.1 Ensiemdefek

3-Metielkrotoniel-KoA-karboksilase is defektief in hierdie siektetoestand (Bannwart *et al.*, 1992:863). Die ensiem kataliseer die karboksilering van 3-metielkrotoniel-KoA tot 3-metielglutakooniel-KoA in die katabolismeweg van L-leusien (Sweetman, 1989:793).

2.5.1.2 Kliniese beeld

Geïsoleerde metielkrotoniel-KoA-karboksilasedefek presenteer met 'n wye spektrum van nie-spesifieke simptome. (Bannwart *et al.*, 1992:866). Bannwart *et al.* (1992:866) onderskei drie tipes op grond van die kliniese beeld, naamlik:

- (i) 'n Neonatale of vroeë infantiele tipe wat vroeg in die lewe begin met konvulsies, hipotonie, respiratoriese probleme, voedingsprobleme en vomering. Hierdie simptome mag tot orgaanbeskadiging van veral die sentrale senuweestelsel lei. Psigomotoriese, verstandelike en ontwikkelingsvertraging word aangetref;
- (ii) 'n infantiele tipe met 'n later aanvang, wat as 'n Reye-sindroomagtige sindroom mag voorkom, met konvulsies, hepatomegalie, hiperammonemie, metaboliese asidose en hipoglukemie en

(iii) 'n juveniele vorm wat tot dusver in slegs een pasiënt tot simptome gelei het. Hierdie tipe word deur vomering en dehidrasie wat tot 'n toestand van subkoma kan lei gekarakteriseer.

Daar is volgens Bannwart *et al.* (1992:867) 'n omgekeerd eweredige verband tussen die aanvangsouderdome en die kliniese ernstighedsgraad van die siekte. Bogenoemde klassifikasie behoort egter nie as die reël beskou te word nie.

Alopesie, veluitslag (Beemer *et al.*, 1982:351), ketose (Gompertz *et al.*, 1973:975, Finnie *et al.*, 1976:513, Tsai *et al.*, 1989:113) en 'n eienaardige reuk van die urien (soos dié van kat-urien (Burton, 1987:368)) (Tsai *et al.*, 1989:111) kan ook met die siekte geassosieer wees.

Tsai *et al.* (1989:113) beskryf die 3-metielkrotoniel-KoA-karboksilasedefek as 'n subtiele aangebore metaboliese defek van die leusienmetabolisme, omdat dit dikwels met 'n voorvallose kindertyd met betreklik milde, sporadiese kliniese manifestasies geassosieer is. Aan die ander kant kan lewensbedreigende episodes van ketose en koma wat met hipoglukemie en asidose gepaard gaan voorkom en sterfte is nie uitgesluit nie.

2.5.1.3 Biochemiese beeld

Die kenmerkende biochemiese bevindings is metaboliese asidose (Finnie *et al.*, 1976:513, Gitzelmann *et al.*, 1987:292, Bannwart *et al.*, 1992:866), hiperammonemie, hipoglukemie (Gitzelmann *et al.*, 1987:290, Tsai *et al.*, 1989:111-113, Rolland *et al.*, 1991:838, Bannwart *et al.*, 1992:866), ketoasidose (Lehnert *et al.*, 1979:109, Kolschütter, 1983:192, Rolland *et al.*, 1991:838) en EEG-abnormaliteite (Bannwart *et al.*, 1992:863).

'n Erge karnitiengebreek word ondervind (Tsai *et al.*, 1989:111,113), met verlaagde plasma-totale sowel as -geësterifiseerde karnitien met 'n verhoogde verhouding van urinêre geasileerde tot vrye karnitien (Bannwart *et al.*, 1992:865).

Urinêre organiese sure

Die twee diagnostiese organiese sure is 3-hidroksi-isovaleriaansuur en 3-metielkrotonielglisien (Bannwart *et al.*, 1992:863) maar die profiel moet in sy geheel van dié van meervoudige karboksilasedefek onderskei word. In laasgenoemde geval kom klein hoeveelhede van die karakteristieke metaboliete van propioonasidemie ook in die urien voor (Tsai *et al.*, 1989:112).

Vrye 3-metielkrotonsuur kan aanwesig wees (Gompertz *et al.*, 1973:975). 2-Oksogluutaarsuur (Lehnert *et al.*, 1979:108) en dikarboksielsure kan teenwoordig wees maar is nie-spesifieke metaboliete (Tsai *et al.*, 1989:112).

2.5.2 3-METIELGLUTAKONIEL-KoA-HIDRATASEDEFEK

2.5.2.1 Ensiemdefek

Daar bestaan vier tipes sindrome waar pasiënte met verhoogde konsentrasies urinêre 3-metielglutakonsuur presenteer. In een van hierdie sindrome is 3-metielglutakoniël-KoA-hidratase defektief. Hierdie ensiem kataliseer hidreering van 3-metielglutakoniël-KoA om 3-hidroksi-3-metielglutariël-KoA in die L-leusien katabolismeweg te vorm (Gibson *et al.*, 1993:121-122).

2.5.2.2 Kliniese beeld

Pasiënte vertoon slegs vertraagde spraakontwikkeling en makrosefalie (Gibson *et al.*, 1993:121).

2.5.2.3 Biochemiese beeld

Urinêre organiese sure

Verhoogde konsentrasies urinêre 3-metielglutakonsuur word in die urien uitgeskei, saam met verhoogde konsentrasies 3-metielglutaarsuur en 3-hidroksi-isovaleriaansuur. Urinêre konsentrasies van 3-metielglutakonsuur daal betekenisvol wanneer L-leusieninname beperk word (Gibson *et al.*, 1993:121).

Die drie ander tipes 3-metielglutakonsuururie hou nie met defektiewe 3-metielglutakoniël-KoA-hidratase-aktiwiteit verband nie en blyk ook nie enige verband met die leusienkatabolisme te hê nie (Gibson *et al.*, 1993:122).

2.5.3 3-HIDROKSI-3-METIELGLUTAARSUURURIE

2.5.3.1 Ensiemdefek

3-Hidroksi-3-metielglutariël-KoA-liase is defektief in hierdie siektetoestand (Ferris & Tien, 1993:559). Die ensiem kataliseer die splyting van 3-hidroksi-3-metielglutariël-KoA aan die einde van die L-leusienkatabolismeweg na asetoasetiel-KoA en asetiel-KoA. Aangesien hierdie ensiem 'n belangrike rol in die ketogeneseweg speel (Thompson *et al.*, 1990:346), het die defek tot gevolg dat die sintese van ketoonliggame nie by hierdie pasiënte kan plaasvind nie (Gibson *et al.*, 1988:180).

2.5.3.2 Kliniese beeld

Die defek presenter in die neonatale (Ozand *et al.*, 1991:174) of infantiele (Thompson *et al.*, 1990:346) lewensfase met vomering (Thompson *et al.*, 1990:346, Vilarinho *et al.*, 1993:154), letargie (Thompson *et al.*, 1990:346) en hipotonie (Wanders *et al.*, 1990:329). Hepatomegalie kan ook voorkom (Thompson *et al.*, 1990:346). Die genoemde simptome kan tot 'n koma ontwikkel (Bakker *et al.*, 1993:1061, Vilarinho *et al.*, 1993:154). Konvulsies kan gedurende die akute periodes ondervind word (Sweetman, 1989:802).

Verder is 'n Reye-sindroomagtige beeld kenmerkend aan 3-hidroksi-3-metielglutaarsuururie (Thompson *et al.*, 1990:346).

2.5.3.3 Biochemiese beeld

Ernstige hipoglukemie (Wanders *et al.*, 1990:327, Ferris & Tien, 1993:559-560, Vilarinho *et al.*, 1993:154) en metaboliese asidose (Wanders *et al.*, 1990:329, Thompson *et al.*, 1990:346, Barash *et al.*, 1990:156) sonder ketose (Gibson *et al.*, 1988:180, Barash *et al.*, 1990:156) en hiperammonemie (Gibson *et al.*, 1988:180, Thompson *et al.*, 1990:346, Wanders *et al.*, 1990:329) kom voor.

Die onvermoë om asetoasynsuur te produseer dra waarskynlik tot die ernstige hipoglukemie by, omdat die glukosesparende effek van vetsuuroksidasie by hierdie pasiënte afwesig is (Gibson *et al.*, 1988:180).

Urinêre organiese sure

Die karakteristieke urinêre organiese sure is 3-hidroksi-3-metielglutaarsuur, 3-metielglutakonsuur, 3-hidroksi-isovaleriaansuur en 3-metielglutaarsuur (Thompson *et al.*, 1990:346, Bakker *et al.*, 1993:1061). Die konsentrasies van hierdie metaboliete verhoog verder tydens kliniese episodes. Verhoogde konsentrasies dikarboksielsure, veral glutaarsuur en adipiënsuur, kan in akute periodes voorkom (Wysocki & Hähnel, 1986:228). Verhoogde konsentrasies melksuur is ook in akute episodes teenwoordig (Ozand *et al.*, 1991:182).

2.5.4 MEERVOUDIGE KARBOKSILASEDEFEK

2.5.4.1 Ensiemdefek

Twee ensiemdefekte kan tot die meervoudige karboksilasedefek aanleiding gee, naamlik 'n holokarboksilasesintetase-defek en 'n biotinidasedefek (Burlina *et al.*, 1988:317). Pasiënte met 'n vroeë aanvang-tipe van die defek het gewoonlik 'n defek in die

holokarboksilasesintetase-ensiem, terwyl biotinidase meestal in 'n laat aanvang-vorm defektief is (Nyhan, 1987:1696).

Holokarboksilasesintetase kataliseer die binding van biotien aan die onaktiewe karboksilase-ensieme (apokarboksilases) om aktiewe holokarboksilases te vorm. In dié proses bind biotien aan 'n lisiensyketting van die ensiem om biositien te vorm. Die defek lei tot verminderde aktiwiteit van drie mitochondriale karboksilase-ensieme, naamlik propioniel-KoA-karboksilase, metielkrotoniel-KoA-karboksilase en piroviel-KoA-karboksilase (Nyhan, 1987:1696-1697).

Biotinidase kataliseer die splyting van biositien om biotien vir hersirkulering vry te stel (Wolf & Heard, 1991:3).

2.5.4.2 Kliniese beeld

Holokarboksilasesintetasedefek

Die holokarboksilasesintetase-defek presenteer meestal in die neonatale periode (Nyhan, 1988:363) of voor die ouderdom van ses weke (Nyhan, 1987:1696a). Die aanvangs-ouderdom kan egter wissel van die eerste lewensdag tot agt maande of selfs so laat as vyftien maande (Nyhan, 1987:1696a).

Die siekte presenteer met die klassieke beeld van 'n organiese suururie, naamlik vomering, hipotonie (Nyhan, 1988:364) of hipertonie (Burlina *et al.*, 1988:318), respiratoriese probleme (Nyhan, 1987:1696a-1697), letargie, ketose en koma (Nyhan, 1988:364). Sterfte as gevolg van die toestand het al voorgekom (Nyhan, 1987:1696a-1697).

Die simptome gaan met die kenmerkende beeld van 'n biotiengebrek gepaard, naamlik velaantasting en alopesie (Wolf & Heard, 1991:12). 'n Eritemateuse uitslag kan oor die hele liggaam voorkom (Nyhan, 1988:364) asook letsels wat soos igtiose en seboreuse

dermatitis lyk. Volledige alopesie mag ontstaan, wat die hare van die hoof, oogwimpers, wenkbroue en lanugohare insluit (Nyhan, 1987:1697).

Indien pasiënte nie in die eerste lewensdae sterf nie, ontwikkel opvallende dermatologiese en neurologiese simptome. Laasgenoemde sluit konvulsies, hipo- en hipertonie, opistotonus en atetose in (Nyhan, 1988:364). Ketotiese episodes kan 'n diep koma tot gevolg hê (Nyhan, 1987:1697).

Biotinidasedefek

Die ouderdom van aanvang van eerste simptome is baie variërend (Wolf & Heard, 1991:6). Die vroegste presenteringsouderdom was volgens Wolf & Heard (1991:6) een tot twee weke en sommige kinders het eers op een jaar of ouer hul eerste simptome getoon. Die gemiddelde presenteringsouderdom is egter vyf tot ses maande (Wolf & Heard 1991:6). Volgens Nyhan (1987:1698) is die aanvangsouderdom van simptome gewoonlik na drie maande of so laat as vier jaar.

Die kliniese beeld is baie heterogeen. Die meeste kinders toon saam met abnormale metabolietprofile 'n kombinasie van karakteristieke neurologiese en kutaneuse simptome (Wolf & Heard, 1991:5). Sommige kinders ondervind slegs apnee en stridor. Hipotonie, konvulsies en alopesie is meestal teenwoordig (Wolf & Heard, 1991:5). 'n Gebrek aan kopbeheer kan ook voorkom (Nyhan, 1987:1698).

Voedingsprobleme, soos vomering of weiering om te eet, mag voorkom. Die kinders mag ook geïrriteerd en letargies wees. Respiratoriese probleme is dikwels teenwoordig en sluit apnee, stridor en hiperventilering in. Die pasiënte toon ook 'n verhoogde vatbaarheid vir infeksies (Wolf & Heard, 1991:5).

Totale of gedeeltelike alopesie is kenmerkend asook 'n veluitslag wat meer gelokaliseerd (kollerig) as in die holokarboksilasesintetase-defek is. (Nyhan, 1988:364). Dit word deur speldepunt makulopapulêre letsels, ekseem en seboree gekenmerk (Wolf & Heard, 1991:5). Eritemateuse aantastings (Mitchell *et al.*, 1986:130) en keratokonjunktivitis

(Nyhan, 1987:1698) is ook algemeen. Meer ernstige, skilferagtige oop letsels wat maklik geïnfekteer kan raak, word ook gevind (Wolf & Heard, 1991:5).

Episodes van ketose soos dié in die holokarboksilase-sintetasedefek, wat lewensbedreigend kan wees, kan voorkom. Sterftegevalle is al aangeteken. Die pasiënte mag in 'n diep koma gaan met hipotermie en die afwesigheid van reflekse (Nyhan, 1987:1698).

Ataksie is 'n prominente kenmerk (Nyhan, 1987:1698) en mag onderbroke saam met siekte-episodes of ander kataboliese stimuli voorkom of kontinu, sodat die pasiënt in die bed moet bly (Nyhan, 1987:1698).

Motoriese en verstandelike vertraging (Nyhan, 1987:1698) en agteruitgang (Mitchell *et al.*, 1986:129) is verdere gevolge van die defek. Neurosensoriese gehoorverlies en oogprobleme, soos verlies van visie en optiese atrofie (Wolf & Heard, 1991:5), blyk die gevolg van onbehandelde gevalle te wees.

'n Eienaardige reuk van die urien is ook al gevind (Erasmus *et al.*, 1985:105).

2.5.4.3 Biochemiese beeld

Holokarboksilasesintetasedefek

Lewensbedreigende episodes van ketose en metaboliese asidose kom voor (Wolf *et al.*, 1983:233, Michalski *et al.*, 1989:315, Nyhan, 1988:363) asook hiperammonemie (Sweetman, 1981:53, Wolf *et al.*, 1983:233, Burton, 1987:362, Nyhan, 1988:364, Goodman & Greene, 1991:32). Melksuur-asidose is kenmerkend. EEG-abnormaliteite en variërende grade van immuundisfunksie word ook aangetref (Nyhan, 1987:1697).

Biotinidasedefek

Soos in die holokarboksilasesintetase-defek, kan lewensbedreigende episodes van asidose (Wolf *et al.*, 1983:233, Nyhan, 1988:364, Lott *et al.*, 1993:399) en erge ketose voorkom

(Munnich *et al.*, 1981:203, Nyhan, 1987:1698, Wolf & Heard, 1991:6,11). Melksuur-
asidose is 'n kenmerkende bevinding (Mitchell *et al.*, 1986:130, Nyhan, 1987:1698) en
milde tot matige hiperammonemie word gevind (Mitchell *et al.*, 1986:130, Riudor *et al.*,
1989:338, Wolf & Heard, 1991:10).

Verlaagde biotienvlakke word in die bloed en urien gevind (Nyhan, 1988:365) wat
moontlik met verhoogde vlakke van biositien verband hou (Riudor *et al.*, 1989:339).
Immunologiese abnormaliteite van 'n variërende aard kom voor (Wolf & Heard, 1991:7).

Urinêre organiese sure

Dieselfde abnormale metaboliete word deur pasiënte met beide die holokarboksilase-
sintetase- en biotinidasedefek uitgeskei (Mitchell *et al.*, 1986:130, Nyhan, 1987:1697-
1698). Die urien van die meeste pasiënte toon die teenwoordigheid van verskeie
organiese sure wat met kataboliese weë van die vertakteketting-aminosure geassosieer
is, terwyl patologiese hoeveelhede van sommige organiese sure in sommige pasiënte slegs
na 'n hoëproteïendieet voorgekom het (Erasmus *et al.*, 1985:105).

Die urinêre metabolietprofiel word deur 3-hidroksi-isovaleriaansuur, 3-metielkroto-
nielglisien of 3-metielkrotonsuur gepredomineer, met kleiner hoeveelhede metaboliete
wat karakteristiek aan propioonasidemie is, soos 3-hidroksipropioonsuur, 2-
metielsitroonsuur en tiglielglisien (Nyhan, 1987:1697-1698). Verhoogde konsentrasies
melksuur is ook kenmerkend (Nyhan, 1988:365).

Organiese suururie is nie 'n vaste kenmerk van die biotinidasedefek nie (Erasmus *et al.*,
1985:105) en sowat 20% van simptomatiese kinders toon geen organiese suururie nie
(Wolf & Heard, 1991:10). Die organiese suururie in die laat aanvang-tipe is volgens
Erasmus *et al.* (1985:105) baie nie-spesifiek en volgens Wolf *et al.* (1983:233) 'n
vertraagde, sekondêre manifestasie van die defek.

2.5.5 METIELMALONIEL-KoA-MUTASEDEFEK

2.5.5.1 Ensiemdefek

Soos die naam aandui, is metiëlmaloniël-KoA-mutase defektief in hierdie aangebore metaboliese defek (Dutra *et al.*, 1993:147). Die toestand is ook bekend as metiëlmaloonasidemie wat as gevolg van een van vier verskillende defekte in die metabolisme van metiëlmaloniël-KoA ontstaan (Ledley, *et al.*, 1990:539). Metiëlmaloniël-KoA-mutase kataliseer die omskakeling van metiëlmaloniël-KoA na suksiniël-KoA (Thompson, 1992:134).

2.5.5.2 Kliniese beeld

Neonatale of infantiele ketose is 'n uitstaande kenmerk van die metiëlmaloniël-KoA-mutasedefek (Rosenberg & Fenton, 1989:821). Ander simptome is letargie, 'n onvermoë om normaal te ontwikkel, episodiese vomering, dehidrasie, respiratoriese probleme, hipotonie, ontwikkelingsvertraging, hepatomegalie en koma (Rosenberg & Fenton, 1989:832).

2.5.5.3 Biochemiese beeld

Ketoasidose is die mees prominente kenmerk van die toestand (Rosenberg & Fenton, 1989:821, Thompson, 1992:134, Inoue *et al.*, 1993:1052). Metiëlmaloonsuurakkumulering in die bloed en weefsels kom vanweë die aard van die defek voor (Dutra *et al.*, 1991:56). Hiperammonemie (Shapira *et al.*, 1991:801, Crane *et al.*, 1992:259, Levy *et al.*, 1993:26), hiperglisienemie en/of -urie, leukopenie, anemie, trombositopenie en in sommige gevalle hipoglukemie (Crane *et al.*, 1992:262, Dutra *et al.*, 1993:147, Levy *et al.*, 1993:26) word ook aangetref. Baie babas sterf in die eerste lewensweek as gevolg van ketoasidose of hiperammonemie of albei (Rosenberg & Fenton, 1989:836). Die chroniese asidose lei in ernstig aangetaste pasiënte tot osteoporose (Morrow, 1974:69).

Metiëlmaloonsuur is die hoof akkumulerende metaboliet in die urien van pasiënte met metiëlmaloonasidemie. Omdat karboksilering van propioniel-KoA 'n omkeerbare reaksie is, akkumuleer propioonsuur en sommige voorlopers (byvoorbeeld butanoon) en metaboliete (byvoorbeeld 3-hidroksipropioonsuur en metiëlsitoensuur) ook in die bloed en urien. Die hoeveelhede van hierdie metaboliete is egter klein in vergelyking met metiëlmaloonsuur. Toediening van proteïene of aminosure wat voorlopers van propioonsuur en metiëlmaloonsuur is, soos metionien, treonien, valien en isoleusien, verhoog metiëlmaloonsuuruitskeiding en in sommige gevalle ketose of asidose. Dit lei ook tot uitskeiding van langkettingketone wat uit die katabolisme van vertakte-kettingaminosure gevorm word (Rosenberg & Fenton, 1989:833).

2.5.6 2-METIELASETOASETIEL-KoA-TIOLASEDEFEK (β -KETOTIOLASEDEFEK)

2.5.6.1 Ensiemdefek

Die defektiewe ensiem is 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolase wat in die isoleusienmetabolisme en ketoonlyggaamverbruik in hepatiese weefsels betrokke is (Søvik, 1993:46-47). Die ensiem kataliseer die splyting van 2-metielasetoasetiel-KoA na propioniel-KoA en asetiel-KoA (Aramaki *et al.*, 1991:64).

Aansienlike genetiese en biochemiese heterogeniteit word met die siekte geassosieer (Søvik, 1993:52). Drie genetiese komplementeringsgroepe (Søvik, 1993:52) is ten opsigte van 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek voorgestel, naamlik:

- (i) Geen ensiemaktiwiteit in pasiënte met episodes van asidose en koma of 'n laat aanvang;
- (ii) geen ensiemaktiwiteit in pasiënte met 'n vroeë aanvang en ernstige siekte en
- (iii) 'n milde fenotipe met ensiemaktiwiteit (Søvik *et al.*, 1992:360-361).

Die groot variasie in kliniese manifestering blyk nie die gevolg van variërende residuele ensiemaktiwiteit te wees nie aangesien verskeie pasiënte wat geen ensiemaktiwiteit getoon het nie, met hoogs variërende kliniese beelde gepresenteer het (Søvik, 1993:51).

2.5.6.2 Kliniese beeld

Die defek word klinies deur ketose, vomering, dehidrasie en letargie wat tot 'n koma kan ontwikkel gekenmerk (Søvik, 1993:46). Die kliniese manifestering toon groot diversiteit (Merinero *et al.*, 1987:276) en wissel van lewensbedreigende siekte met erge ketose, koma en kardiomiopatie, tot 'n milder verloop met slegs episodes van vomering (Søvik, 1993:47). Asimptomatiesse gevalle kan ook voorkom (Søvik, 1993:49-50). Ketose is in alle pasiënte gevind, behalwe in asimptomatiesse gevalle. Vomering en dehidrasie is predominerende simptome (Søvik, 1993:49). Hiperventilering asook neurologiese simptome word dikwels ondervind. Verskeie simptome van die sentrale senuweestelsel kan voorkom, naamlik enkefalopatie, hipotonie, verswakte refleksie, ataksie, displegie, geïrriteerdheid en spraakprobleme. Ontwikkelingsvertraging en psigomotoriese skade en vertraging en ontwikkelingsagteruitgang is aangetoon (Søvik, 1993:49-50). Die defek is ook in 'n vyftien-jarige seun met 'n agt-jaarlange geskiedenis van hoofpyne en episodes van metaboliese asidose in die vroeë kinderjare, gediagnoseer (Middleton & Bartlett, 1983:292).

Die ouderdom van die aanvang van kliniese simptome varieer grootliks (Merinero *et al.*, 1987:276), maar is volgens Søvik (1993:49) dikwels tussen ses en vier-en-twintig maande. Neonatale gevalle kom selde voor en die toestand kan in sommige gevalle eers in die latere kinderjare 'n aanvang neem (Søvik, 1993:49).

2.5.6.3 Biochemiese beeld

Eрге ketoasidose (Nagasawa *et al.*, 1989:148, Aramaki *et al.*, 1991:63, Søvik, 1993:47), metaboliese asidose (Merinero *et al.*, 1987:276, Aramaki *et al.*, 1991:63, Søvik, 1993:50) van variërende ernstigheidsgraad (Middleton, 1987:270), kardiomiopatie (Søvik, 1993:47,49) en hiperammonemie (Burton, 1987:362, Goodman & Greene, 1991:32)

kenmerk die biochemiese profiel. Volgens Søvik (1993:50) kom hiperammonemie egter net in ongeveer 10% van gevalle voor.

Hoewel daar verwag word dat die ensiemdefek verminderde ketoonliggaamproduksie en -verbruik sal veroorsaak, lei dit selde tot hipoglukemie (Søvik, 1993:49).

Urinêre organiese sure

Die organiese suururie in β -ketotiolasedefek is baie heterogeen (Søvik *et al.*, 1992:359), hoewel 2-metiel-3-hidroksibottersuur en tiglielglisien byna altyd voorkom. 2-Metielasetoasynsuur en 2-butanon (die dekarboksileringsproduk van 2-metielasetoasynsuur) kom soms voor (Søvik, 1993:51). Die konsentrasies van 2-metielasetoasynsuur is baie variërend omdat dit onstabiel is en nie-ensiematies na 2-butanon gedekarboksileer word (Aramaki *et al.*, 1991:63-64). Asetoasynsuur en 3-hidroksibottersuur word gedurende akute episodes saam met die ander karakteristieke metaboliete in verhoogde konsentrasies uitgeskei as gevolg van kompetisie tussen 2-metielasetoasetiel-KoA en asetoasetiel-KoA vir die 2-metielasetoasetiel-KoA-ensiem (Søvik, 1993:51). 'n Toename in uitskeiding van die karakteristieke metaboliete vind ook tydens ketoasidose plaas (Leonard *et al.*, 1987:211).

Aansienlike variasies kan in die patrone en hoeveelhede organiese sure voorkom. Die uitskeiding van bogenoemde metaboliete in 'n pasiënt met normale 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolase-aktiwiteit is al gevind (Søvik, 1993:51). In 'n ander pasiënt was die konsentrasies van 2-metiel-3-hidroksibottersuur, tiglielglisien en 2-metielasetoasynsuur laag, selfs tydens ketoasidose en isoleusienbelading (Leonard *et al.*, 1987:211).

2.5.7 SUKSIENSUURSEMIALDEHIED-DEHIDROGENASEDEFEK (4-HIDROKSIBOTTERSUURURIE)

2.5.7.1 Ensiemdefek

4-Hidroksibottersuururie is 'n defek van die metabolisme van 4-hidroksibottersuur (gamma-hidroksibottersuur) (Jakobs *et al.*, 1992:466). Die defektiewe ensiem is suksiensuursemialdehid-dehidrogenase wat die omvorming van suksiensuursemialdehid na suksiensuur kataliseer (Gibson *et al.*, 1991:219).

2.5.7.2 Kliniese beeld

'n Wye spektrum kliniese simptome word met 4-hidroksibottersuururie geassosieer (Gibson *et al.*, 1989:609). Pasiënte presenteer met kombinasies van die volgende simptome: hipotonie, ataksie, hiperaktiwiteit, gedragsprobleme, konvulsies en/of outistiese kenmerke, psigomotoriese vertraging (Jakobs *et al.*, 1992:466) en milde verstandelike vertraging (Rating *et al.*, 1984:91).

2.5.7.3 Urinêre organiese sure

Die primêr akkumulerende metaboliet is 4-hidroksibottersuur (Jakobs *et al.*, 1992:466). Hierdie verbinding is 'n neurotransmittor en is as 'n farmakologies aktiewe substans bekend (Gibson *et al.*, 1988:530, Pattarelli *et al.*, 1988:455). Ander urinêre metaboliete kan 3,4-dihidroksibottersuur, glikolsuur (Jakobs *et al.*, 1990:341), 4,5-dihidroksiheksanoësuur (Gibson *et al.*, 1989:609), glisien en die dikarboksielsure glutaarsuur, adipiënsuur, suberiënsuur en sebakiënsuur (Gibson *et al.*, 1989:607,609) insluit. Die teenwoordigheid van 2,4-dihidroksibottersuur, 2-hidroksiglutaarsuur en 2-hidroksi-2-metiëlsuksiënsuur (sitramaliënsuur) is ook al gedokumenteer (Onkenhout *et al.*, 1989:195).

2.6 DIE METABOLISME VAN METIELSUKSIENSUUR IN ANDER ORGANISMES

2.6.1 Die metabolisme van itakonsuur en mesakonsuur in soogdierlewer

Itakonsuur, mesakonsuur en beide D- en L-sitramaliensuur kom natuurlik in verskeie plantmateriale voor (Lardy, 1969:314).

Krimpvarklewer-mitochondria oksideer itakonsuur volledig na CO_2 in 'n medium van 5 mM MgCl_2 , 17 mM fosfaatbuffer, pH 7.3 en 100 mM KCl_2 . Die tempo van hierdie oksidasie is vergelykbaar met die oksidasie van suksiensuur na 3-hidroksibottersuur. Rotlewer-mitochondria oksideer itakonsuur teen ongeveer 25% van hierdie tempo. Mitochondria van rotbrein en -nier, of marmotlewer kataliseer nie die oksidasie van itakonsuur nie. Krimpvarklewer-mitochondria oksideer mesakonsuur 12.5% so vinnig as itakonsuur en metielsuksiensuur 16.7% so vinnig as itakonsuur. DL-sitramaliensuur word volgens Lardy (1969:314) nie teen 'n meetbare tempo geoksideer nie. Sitrakonsuur word nie teen 'n meetbare tempo in intakte marmotlewer-mitochondria geoksideer nie maar ekstrakte van hierdie mitochondria skakel dit om na dieselfde produkte as itakonsuur (soos hieronder beskryf word) (Lardy, 1969:314).

Montgomery *et al.* (1983:641-644) het die *trans*-dehidrogenering van metielsuksiensuur na metielfumaarsuur aangetoon deur beladingstudies met metielsuksiensuur in rotte. Die vorming van metielsuksiensuur is ook aangetoon deur beladings met etielmaloonsuur. Die urinêre konsentrasies van hierdie metaboliete is na belading gemeet om tot die gevolgtrekkings te kom.

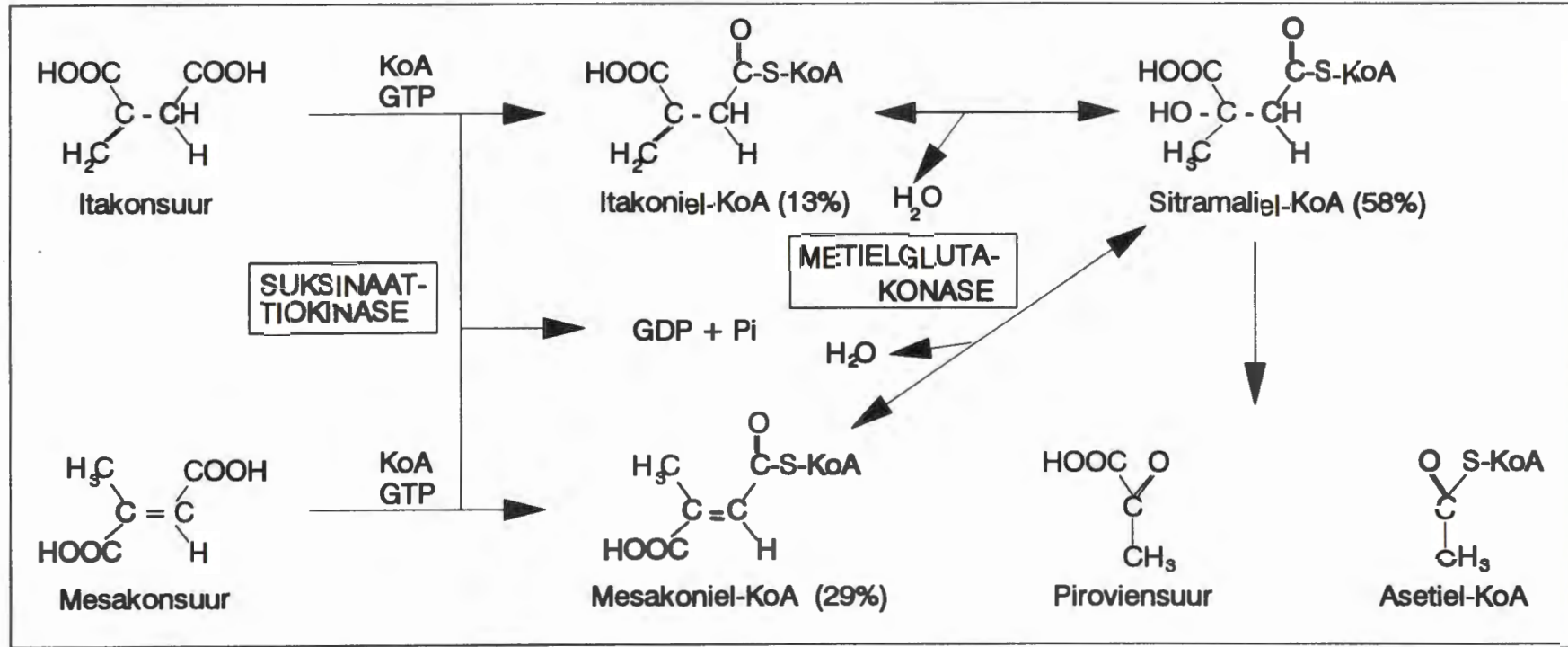
2.6.2 Die oksidasie van itakonsuur deur bereidings met gesuiwerde ensieme

Die kataboliese weg vir itakonsuurdegradasie, soos deur fraksionering van mitochondriale ekstrakte en deur die gebruik van bekende, gesuiwerde ensieme opgeklar is, word in Figuur 2.7 getoon. Itakonsuur en mesakonsuur word deur suksinaattiokinase na die ooreenstemmende KoA-tio-esters omgeskakel. Metielglutakonase skakel hierdie twee verbindings om na sitramaliel-KoA, om 'n ewilibrum-mengsel van 13% itakoniël-KoA,

58% sitramaliel-KoA en 29% mesakoniel-KoA by 20 °C en pH 7.4 te lewer (Lardy, 1969:315).

Sitramaliel-KoA word deur 'n ensiem in die mitochondriale ekstrak gesplyt om asetiel-KoA en piroviensuur te vorm. 'n Soortgelyke reaksie hieraan is die splyting van 3-hidroksi-3-metielglutariel-KoA om asetiel-KoA en asetoasetiel-KoA te vorm. Dit is nie seker of die splyting van sitramaliel-KoA na piroviensuur en asetiel-KoA deur 'n spesifieke ensiem, of deur 'n nie-spesifieke ensiem wat die hoof funksie het om 'n chemies-verwante reaksie te kataliseer, uitgevoer word nie. Laasgenoemde blyk volgens Lardy (1969:315) meer waarskynlik te wees.

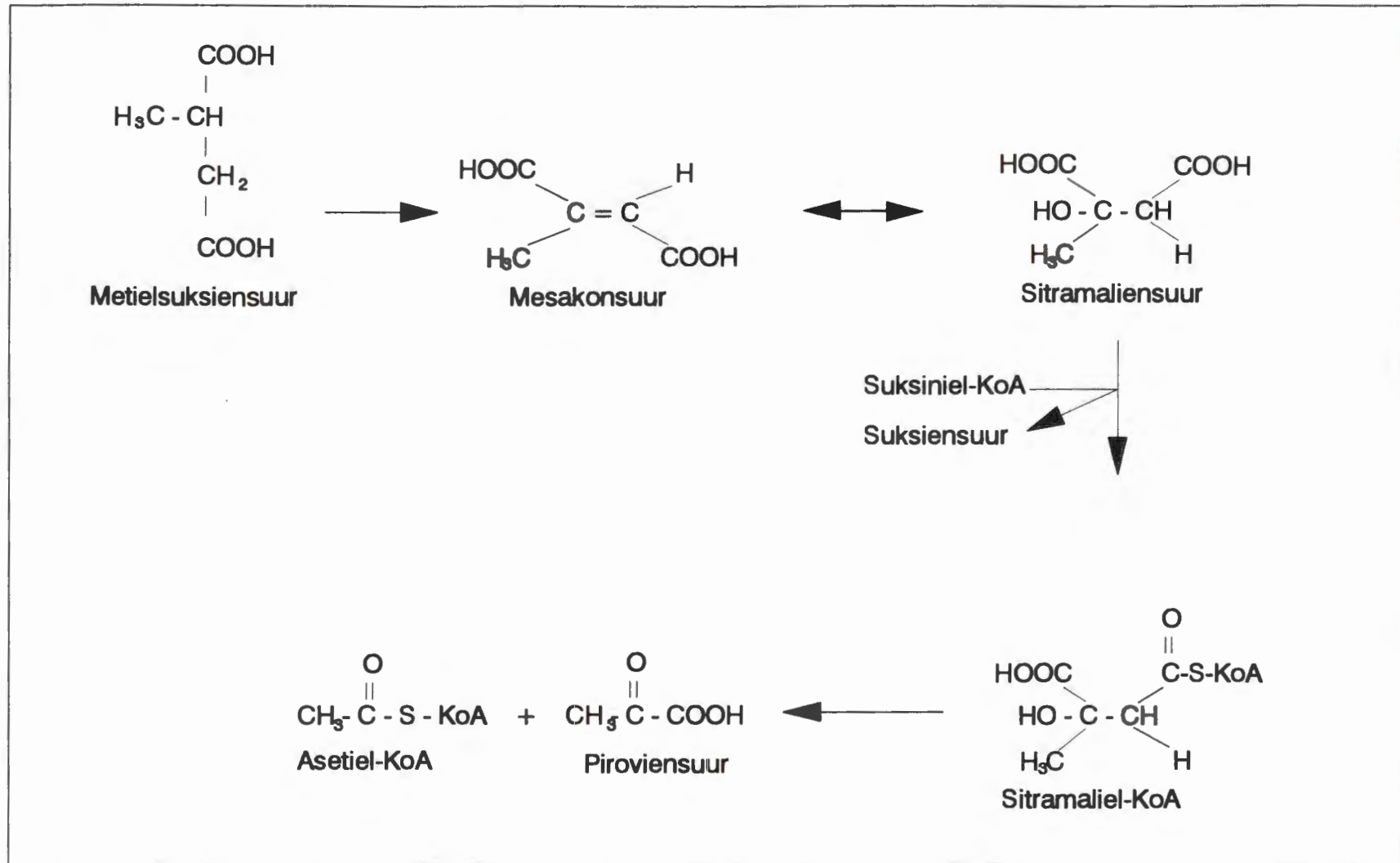
Die ensiemfraksie wat die splyting van sitramaliel-KoA kataliseer het nie piroviensuur-¹⁴C in itakonsuur of mesakonsuur geïnkorporeer wanneer dit met gemerkte piroviensuur en asetiel-KoA geïnkubeer is nie. Die splytingsreaksie blyk daarom onomkeerbaar onder eksperimentele toestande te wees (Lardy, 1969:315). Die sintese van sitramaliel-KoA vanuit piroviensuur en asetiel-KoA deur selvrye ekstrakte van *Chromatium* is deur Losada *et al.* (1960:757) aangetoon.



Figuur 2.7 Die katabolisme van itakonsuur in soogdiere (Lardy, 1969:316).

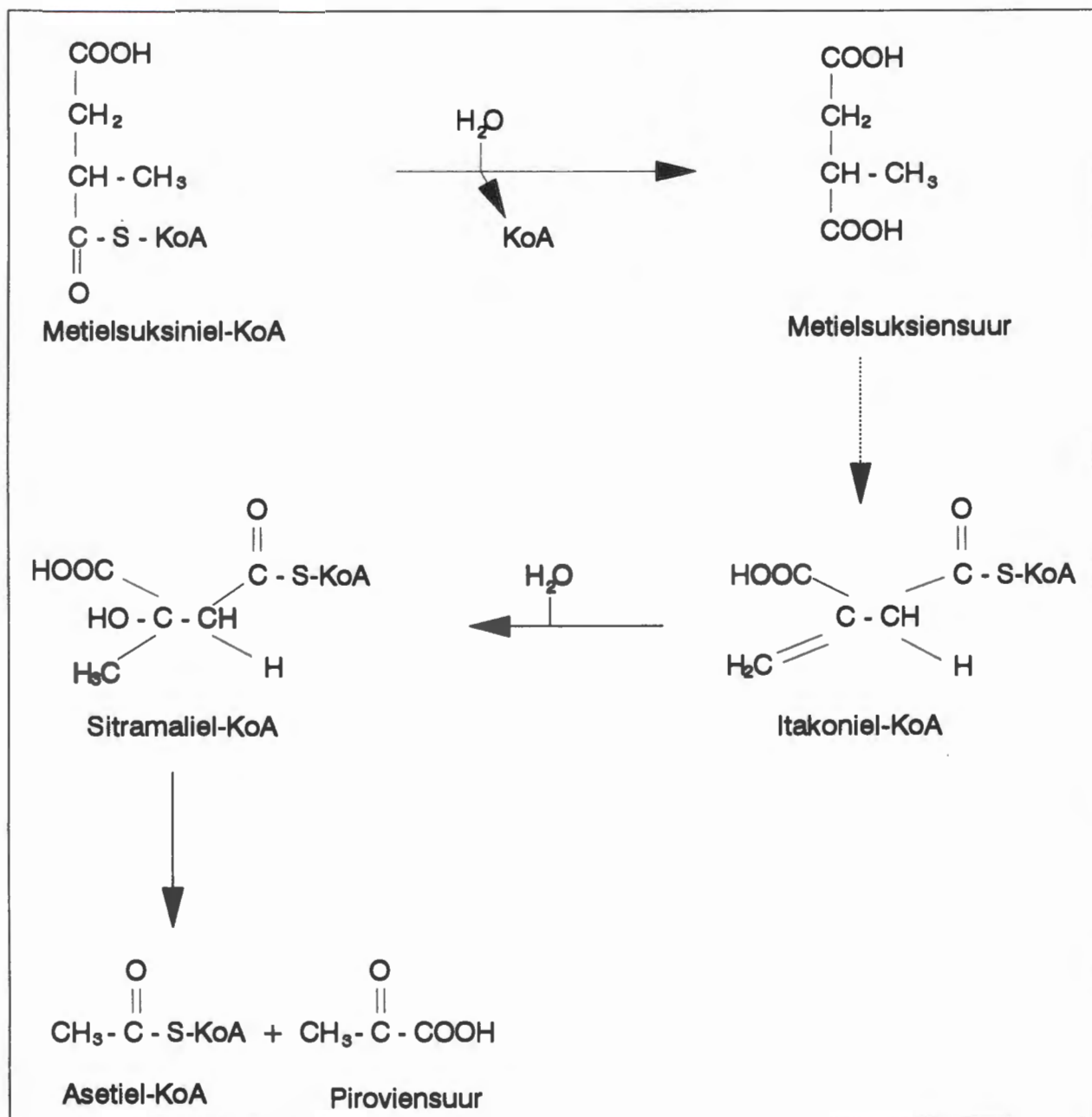
2.6.3 Die metabolisme van metielsuksiensuur, itakonsuur, mesakonsuur en sitramaliensuur in bakterieë

Behalwe vir die degradasieweg van vrye mesakonsuur in *Chromatium* (sien hieronder), kataliseer verskeie mikroorganismes reaksies van itakonsuur, mesakonsuur, sitramaliensuur of metielsuksiensuur deur die weg wat hierbo vir soogdierlewer beskryf is (Figuur 2.7). Daar is gevind dat verskeie *Pseudomonas*-spesies die reaksievolgorde in Figuur 2.7 kataliseer. Behalwe vir die suksinaat-aktiveringsensieme, besit hierdie organismes ook 'n transferase-ensiem wat itakonsuur en sitramaliensuur na hul respektiewelike KoA-tio-esters omskakel deur met suksiniel-KoA te reageer. *Pseudomonas*-spesies het ook beide die D- en L-isomere van metielsuksiensuur na mesakonsuur geoksideer, wat via sitramaliensuur en sitramaliel-KoA na piroviensuur en asetiel-KoA omgeskakel is (Figuur 2.8). Dit is in teenstelling met 'n soogdiersisteem, waarin slegs L-metielsuksiensuur gedehidrogeneer is, met mesakonsuur as direkte produk (Lardy, 1969:317-318).



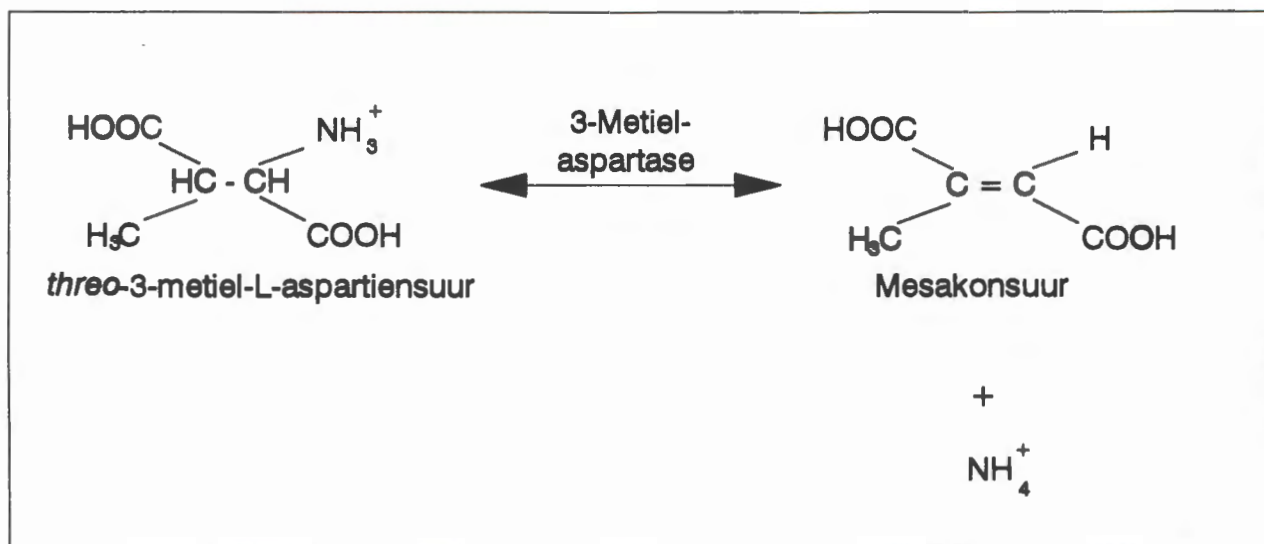
Figuur 2.8 Die katabolisme van metielsuksiensuur in *Pseudomonas* (Lardy, 1969:317).

Trichosporon cutaneum degradeer *p*-kresol deur 'n aantal reaksies tot metielsuksiniel-KoA, wat via itakoniel-KoA en sitramaliel-KoA na asetiel-KoA en piroviensuur gekataboliseer word (Figuur 2.9) (Powlowski & Dagley, 1985:1128).



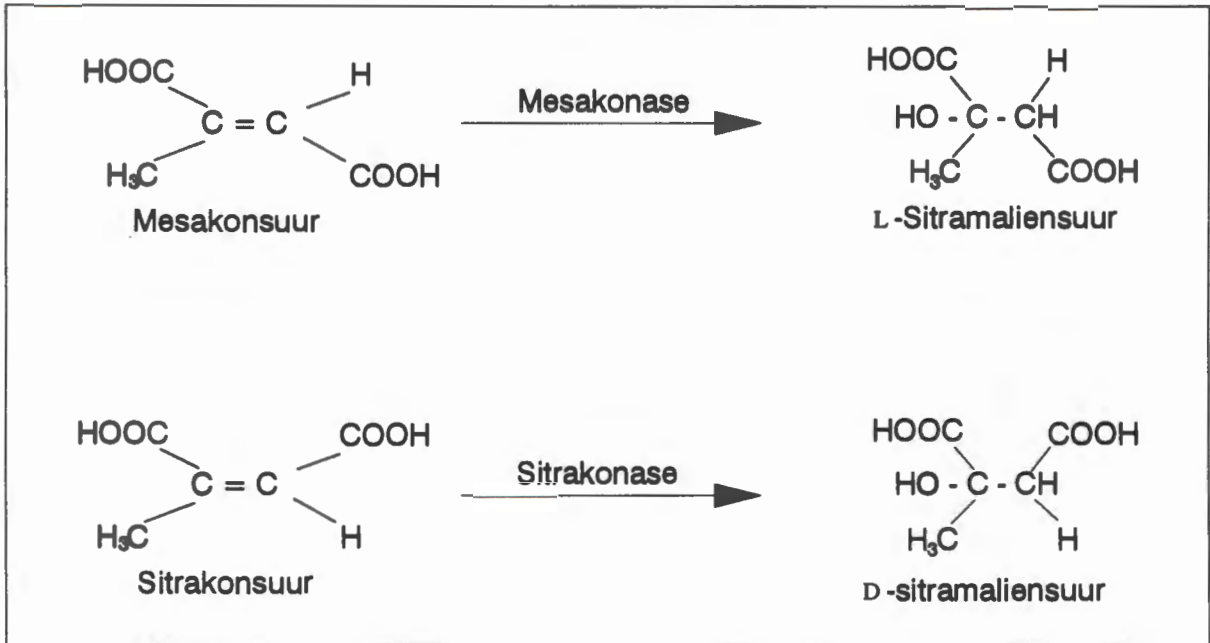
Figuur 2.9 Die degradasie van metielsuksiensuur deur *Trichosporon cutaneum* (Powlowski & Dagley, 1985:1128).

Clostridium tetanomorphum besit 'n 3-metielaspartase wat 'n omkeerbare reaksie tussen L-treo-3-metielaspartienuur en mesakonsuur kataliseer (Hsiang & Bright, 1969:347) (Figuur 2.10). Mesakonsuur en fumaarsuur kan as substrate vir die omgekeerde reaksie optree (Barker *et al.*, 1962:827,831).



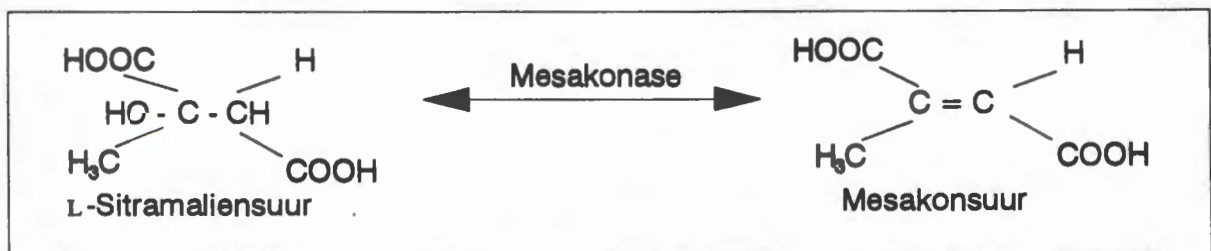
Figuur 2.10 Die metabolisme van mesakonsuur in *Clostridium tetanomorphum* (Hsiang & Bright, 1969:347).

Pseudomonas-spesies besit ook 'n mesakonase, wat mesakonsuur na D-sitramalienuur omskakel (Figuur 2.11). Indien die organismes met sitrakonsuur as substraat gekweek word vertoon dit 'n mesakonase sowel as 'n sitrakonase-aktiwiteit, wat sitrakonsuur na L-sitramalienuur dehidreer (Lardy, 1969:318) (Figuur 2.11).



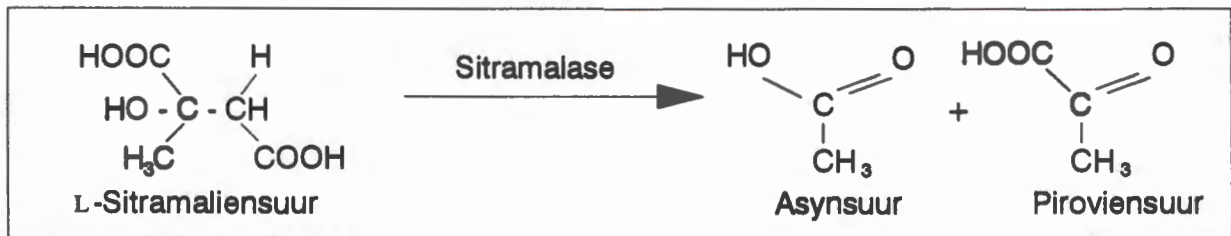
Figuur 2.11 Die katabolisme van mesakonsuur en sitrakonsuur in *Pseudomonas* (Lardy, 1969:318).

Clostridium tetanomorphum besit 'n L-sitramaathidrolase (mesakonase) wat L-sitramaliensuur na mesakonsuur omvorm (Figuur 2.12). L-sitramaliensuur, L-appelsuur, mesakonsuur en fumaarsuur is bekende substrate vir hierdie ensiem. Die D-isomere van sitramaliensuur en appelsuur is nie substrate nie (Wang & Barker, 1969:331).



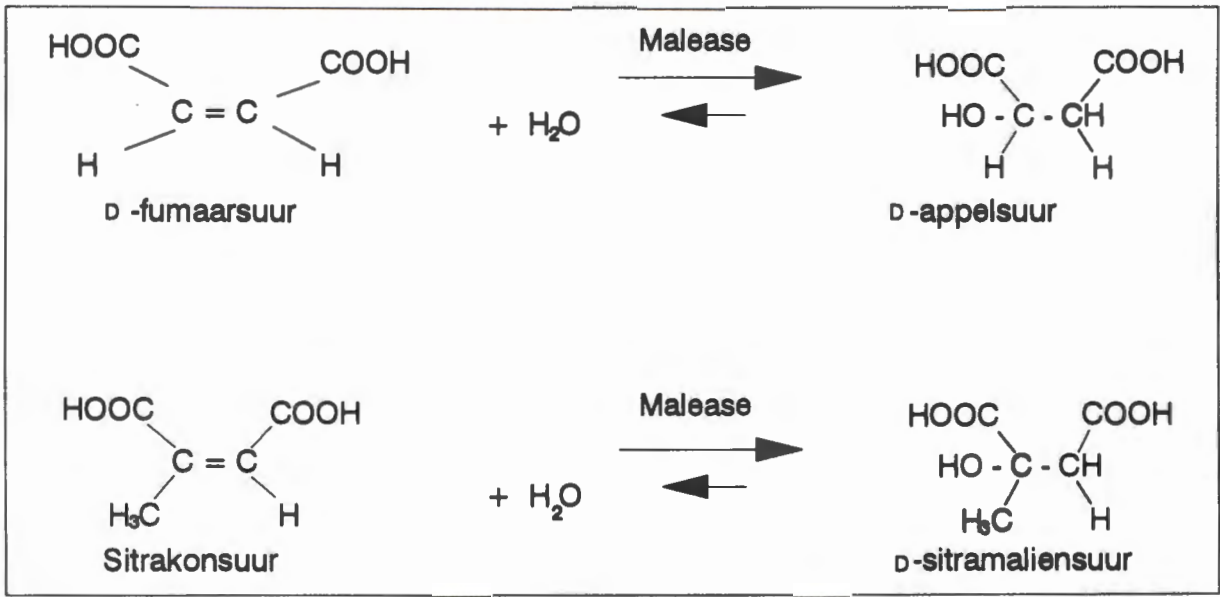
Figuur 2.12 Die metabolisme van L-sitramaliensuur en mesakonsuur in *Clostridium tetanomorphum* (Wang & Barker, 1969:331).

Sitramalaat-pirovaatlase (sitramalase) is in *Clostridium tetanomorphum* gevind, met glutamiensuur as hoof-energiebron. L-sitramaliensuur is die enigste bekende substraat wat in studies deur die liase gesplyt is (Figuur 2.13). D-sitramaliensuur, DL-isositroensuur, DL-appelsuur, sitroensuur en mesakonsuur is nie na die respektiewelike ketosure omgeskakel onder toestande wat vinnige splyting van sitramaliensuur na piroviensuur en asynsuur bewerkstellig het nie (Barker, 1969:344, 346).



Figuur 2.13 Die katabolisme van L-sitramaliensuur in *Clostridium tetanomorphum* (Barker, 1969:344).

Malease van *Pseudomonas pseudoalcaligenes* kataliseer die hidrasie van beide D-fumaarsuur en sitramaliensuur na D-appelsuur en D-sitramaliensuur respektiewelik. Maleaathidratase (malease) kataliseer stereospesifieke hidrasie van maleaat (*cis*-fumaarsuur) na D-appelsuur (Figuur 2.14). Die ensiem is taamlik algemeen in mikro-organismes teenwoordig en is uit *Pseudomonas pseudoalcaligenes* gesuiwer. In teenstelling met malease van konynnier, kataliseer malease van *Ps. pseudoalcaligenes* ook stereospesifieke hidrasie van sitrakonsuur na D-sitramaliensuur teen betekenisvolle tempo's (Figuur 2.14) (Van der Werf *et al.*, 1993:1011).



Figuur 2.14 Die hidrasiereaksies van D-fumaarsuur en sitrakonsuur in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Van der Werf *et al.*, 1993:1012).

2.7 DIE MOONTLIKE EFFEK VAN METIELSUKSIENSUUR

Sover dit die literatuur betref, is daar slegs een moontlike nadelige effek van metielsuksiensuur vermeld. Truscott *et al.* (1981:200-201) het aangetoon dat metielsuksiensuur moontlik deur suksinaatdehidrogenase tot mesakonsuur gedehidrogeer kan word. Volgens hierdie outeurs mag metielsuksiensuur met die behoorlike funksionering van twee sleutel-metaboliese weë, naamlik die Krebs siklus en die elektrontransportketting, inmeng omdat suksinaatdehidrogenase 'n komponent van beide hierdie weë is.

Hoewel daar nie veel oor die kliniese effek van metielsuksiensuur in die literatuur beskryf of gespekuleer is nie, het 'n aantal navorsers die effek van metielmaloonsuur bestudeer. Omdat metielsuksiensuur struktureel aan metielmaloonsuur verwant is, sou die effekte van metielmaloonsuur leidrade oor die moontlike effekte van kon metielsuksiensuur verskaf.

Volgens Shevell *et al.* (1993:622) funksioneer metielsuksiensuur as 'n potensiële toksien om tot neurologiese disfunksie aanleiding te gee en dit kan ook sekondêr asidose, ketose, hiperammonemie en hipoglukemie tot gevolg hê.

Volgens Shapiro *et al.* (1978:987) en Dutra *et al.* (1993:147) kan metielmaloonsuur en metielmaloniel-KoA 'n aantal diverse metaboliese effekte uitoefen.

Metielmaloonsuur inhibeer suksinaatdehidrogenase en 3-hidroksibutiraatdehidrogenase in die brein en lewer (Dutra *et al.*, 1993:147). Volgens Dutra *et al.* (1993:150) veroorsaak metielmaloonsuur 'n 53% inhibisie van suksinaatdehidrogenase-aktiwiteit. Metielmaloonsuur veroorsaak 'n kompeterende inhibisie van die omsetting van 3-hidroksibottersuur na asetoasynsuur deur 3-hidroksibutiraatdehidrogenase in die brein en lewer (Patel *et al.*, 1976:41, Dutra *et al.*, 1993:148,151). Dutra *et al.* (1993:152) het aangetoon dat metielmaloonsuur 'n 48% vermindering in die totale ketoonliggaamproduksie deur hierdie inhibisie veroorsaak. Die konsentrasies van metielmaloonsuur in die plasma van metielmaloonasidemiepatiënte veroorsaak 'n aansienlike kompeterende inhibisie van 3-hidroksibutiraatdehidrogenase-aktiwiteit in die hart en lewer van proefdiere (Patel *et al.*, 1976:41, Dutra *et al.*, 1991:62). Verlaagde bloedvlakke van 3-hidroksibottersuur is in metielmaloonsuur-behandelde rotte gevind (Dutra *et al.*, 1991:63). Inhibisie deur metielmaloonsuur kan dus beide die produksie en metabolisme van 3-hidroksibottersuur verminder (Shapiro *et al.*, 1978:987, Dutra *et al.*, 1993:152).

Hipoglukemie

Hipoglukemie is moontlik die gevolg van verminderde glukoneogenese as gevolg van inhibisie van pirovaatkarboksilase deur metielmaloniel-KoA (Halperin *et al.*, 1971:2276, Gorgio, 1976:1137, Patel *et al.*, 1976:41, Shapiro *et al.*, 1978:987, Whelan *et al.*, 1979:1233, Dutra *et al.*, 1993:150). Volgens Shapiro *et al.* (1978:987) verminder metielmaloniel-KoA pirovaatkarboksilase-aktiwiteit deur met propioniel-KoA of asetiel-KoA te kompeteer. 'n Ander verduideliking vir hipoglukemie was dat metielmaloonsuur die omsetting van suksiensuur na fumaarsuur in die lewer gedeeltelik blokkeer en glukoneogenese belemmer deur (i) blokkering van die weg wat deur verskeie aminosure gevolg word om glukose deur die Krebs siklus te vorm en (ii) vermindering van die hoeveelheid energie en reduserende ekwivalente wat vir glukosesintese benodig word. (Dutra *et al.*, 1993:150).

Bogenoemde outeurs het ook die moontlikheid gestel dat die brein se glukoseverbruik ná hipoglukemie erg belemmer is en dat die alternatiewe brandstof van ketoonliggame beperk word as gevolg van inhibisie van 3-hidroksibutiraatdehidrogenase in die lewer, met gevolglike verminderde ketoonliggaamproduksie en dus verminderde beskikbaarheid daarvan vir die brein (Dutra *et al.*, 1993:152).

Eksperimentele resultate het aangetoon dat metielmaloonsuur die mitochondria kan binnegaan (vermoedelik deur middel van die karboksilaatdraer) en weer op die trikarboksilaat- of 2-ketoglutaraatdraer uitgevoer word (Halperin *et al.*, 1971:2277). Daar is ook deur hierdie navorsers aangetoon dat metielmaloonsuur malaattransport na die mitochondria inhibeer sodat 'n inhibisie van malaatoksidasie deur metielmaloonsuur waargeneem word. Inhibisie van die transport van malaat, 2-ketoglutaraat en isositraat deur maloonsuur is deur hierdie navorsers aangetoon (Halperin *et al.*, 1971:2276, 2279-2280) asook deur Shapiro *et al.* (1978:987). Die waargenome inhibisie van die mitochondriale dikarboksilaattransportsisteen kan gedeeltelik vir die hipoglukemie geassosieer met metielmaloonasidemiepatiënte, verantwoordelik wees (Halperin *et al.*, 1971:2280). Patel *et al.* (1976:41) dui ook aan dat hipoglukemie veroorsaak kan word

deurdat metiëlmaloonsuur die transport van malaat deur die dikarboksilaatdraer in die lewermitochondria inhibeer.

Dit blyk volgens Halperin *et al.* (1971:2276) dat metiëlmaloonsuur, wat akkumuleer wanneer metiëlmaloniel-KoA nie geredelik na suksiniel-KoA omgeskakel kan word nie, die transport van L-malaat oor die mitochondriale membrane sou kon inhibeer, soos ook ander malonaatderivate, byvoorbeeld butiëlmalonaat en pentiëlmalonaat. Gorgio (1976:1137) het aangetoon dat karboksi-asiel-KoA-derivate die allosteriese aktivering van pirovaatkarboksilase deur asetiel-KoA inhibeer. Tanaka *et al.* (1977:987) het hipoglukemie in hul SCAD-pasiënt aan 'n inhibisie van glukoneogenese deur etiëlmaloniel-KoA toegeskryf. Metiëlmaloonsuur mag op sigself deur al drie draersisteme van malaat getranspoteer word. Hiervolgens is 'n hipotese opgestel vir die algemene meganismes van hipoglukemie in pasiënte met metiëlmaloniel-KoA-mutasedefekte (Halperin *et al.*, 1971:2276-2277).

Samevatting

Regulatoriese reaksies vir glukoneogenese word moontlik deur metiëlmaloonsuur of metiëlmaloniel-KoA geïnhibeer. Dit is moontlik dat metiëlmaloonsuur glukoneogenese inhibeer deur blokkering van suksinaatdehidrogenase, malaatuitgang of beide te veroorsaak. Akkumulering van metiëlmaloonsuur inhibeer glukoneogenese deur inhibisie van die pirovaatkarboksilasereaksie en van malaattransport. Dit blyk uit studies dat die plasma-metiëlmaloonsuurkonsentrasies in metiëlmaloonasidemiepasiënte die malaattransportsisteme sal inhibeer (Halperin *et al.*, 1971:2280-2281).

Groot hoeveelhede metiëlmaloonsuur akkumuleer in die weefsels van pasiënte met metiëlmaloonasidemie wat met gereelde episodes van hipoglukemie en ketoasidose presenteer (Dutra *et al.*, 1991:63). Meeste pasiënte wat die vroeë fases van die siekte oorleef toon variërende grade van neuromotoriese vertraging. Omdat glukose en ketoonliggame albei essensiële substrate vir breinmetabolisme is, is dit moontlik dat Dutra *et al.* (1991:56-63) se bevindings in 'n sekere mate mag bydra tot 'n begrip van die biochemiese basis van verstandelike vertraging in hierdie pasiënte.

Metaboliese asidose

Akkumulering van metielmaloonsuur in die plasma asook oormatige mobilisering van vet as gevolg van hipoglukemie kan volgens Patel *et al.* (1976:41) vir metaboliese asidose verantwoordelik wees. Inhibisie van sitraatsintetase en isositraatdehidrogenase deur 2-metielsitroensuur en dus verhoogde sintese van ketoonliggame, kan ook volgens hierdie outeurs tot metaboliese asidose bydra.

Hiperammonemie

Volgens Stacey *et al.* (1985:181), Gibson *et al.* (1988:85) en Catzeflis *et al.* (1990:580) word hiperammonemie veroorsaak deur 'n gebrek aan asetiel-KoA vir die produksie van N-asetielglutamiensuur. Laasgenoemde is 'n allosteriese aktiveerder van die ureumsiklus (karbamielfosfaatsintetase). Met 'n verlaagde produksie van N-asetielglutamiensuur is die opruiming van ammoniak in die liggaam ook belemmer, wat tot hiperammonemie aanleiding gee (Gregersen, 1985:42, Stacey *et al.*, 1985:181). In die geval van hierdie studie sal die oksaalasynsuurvlakke, in plaas van die asetiel-KoA-vlakke, verlaag wees as gevolg van inhibisie van malaatdehidrogenase deur van die kataboliese produkte van metielsuksiensuur. Oksaalasynsuur is ook 'n substraat vir die vorming van N-asetielglutamiensuur en hiperammonemie sou moontlik deur dieselfde meganisme kon ontstaan.

HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTELE METODEDES

3.1 INLEIDING

Hierdie hoofstuk word aan 'n gedetailleerde beskrywing van die eksperimentele protokol van die studie gewy.

3.2 KLINIESE BESKRYWINGS VAN DIE PASIËNTE

Die pasiënte wat in die studie gebruik is, is in die siftingsprogram vir aangebore metaboliese afwykings van die Departement Biochemie aan die PU vir CHO gediagnoseer.

3.2.1 Propioonasidemie

3.2.1.1 Pasiënt BB

BB is in 1983 na 'n normale swangerskap van nie-verwante ouers gebore. BB ('n seuntjie) was die eerste kind van die gesin en daar was geen geskiedenis van abnormaliteite in beide ouers se families nie. BB het kort na geboorte met erge keto- en metaboliese asidose, hipotonie, vomering, hiperventilering, hiperammonemie en koma voorgedoen. 'n Metaboliese defek is vermoed en 'n urienmonster is na die Departement Biochemie verwys. Kwantitatiewe aminosuuranalises het verhoogde urinêre glisien (2 203.5 mmol/mol kreatinien) en lisien (2.33 mmol/mol kreatinien) getoon. Organiese suuranalises het verhoogde konsentrasies van die diagnostiese organiese sure van propioonasidemie getoon (metielsitroensuur: 423 mmol/mol kreatinien, propionielglisien: 48 mmol/mol kreatinien, 3-hidroksipropioonsuur: 2 121 mmol/mol kreatinien). Die diagnose is op grond van hierdie resultate gemaak. BB is op die ouderdom van drie weke oorlede. Die diagnose is nie deur ensiemanalises bevestig nie maar ensiemanalises

is op 'n latere baba (WB) van die gesin uitgevoer. Die propioniel-KoA-karboksilase-ensiem het slegs 0.68% van die aktiwiteit van kontrolepasiënte getoon.

3.2.1.2 Pasiënt ML

ML is in 1984 na 'n normale swangerskap van nie-verwante ouers gebore. Enkele weke na geboorte het metaboliese asidose, hiperammonemie, vomering, hiperventilering en konvulsies voorgekom. ML ('n dogtertjie) was die derde kind van die gesin. Twee vorige kinders, 'n tweeling, het enkele maande na geboorte gesterf nadat hulle dieselfde simptome getoon het. Die familiegeskiedenis sowel as die kliniese beeld het op die moontlikheid van 'n metaboliese defek gedui en 'n urienmonster van die baba is vir 'n ondersoek na die laboratorium verwys. Kwantitatiewe aminosuuranalises het geweldig verhoogde urinêre glisienkonsentrasies (14.64 mol/mol kreatinien) getoon. Al die diagnostiese organiese sure van propioonasidemie was in hoë konsentrasies in die urien teenwoordig (metielsitroensuur: 369 mmol/mol kreatinien, propionielglisien: 231 mmol/mol kreatinien, 3-hidroksipropioonsuur: 607 mmol/mol kreatinien). Die aktiwiteit van propioniel-KoA-karboksilase in fibroblaste was ongeveer 1% van die aktiwiteit van kontrolepasiënte. Die baba is met 'n lae proteïendieet en biotien behandel. Dit het aanvanklik voorgekom of die baba positief op die dieet reageer maar kritieke periodes het weer na enkele dae voorgekom. Baba ML is op die ouderdom van ses maande oorlede.

3.2.1.3 Pasiënt RK

Pasiënt RK is in 1985 na 'n induksie op 42 weke swangerskap as die eerste kind van nie-verwante ouers gebore. RK ('n seuntjie) het aanvanklik normaal en gesond voorgekom maar het op die derde dag na geboorte hipotonie ontwikkel. Geen asidose was teenwoordig nie maar hiperammonemie was teenwoordig. Spontane herstel het oor die volgende vier dae voorgekom en RK is op die elfde dag na geboorte ontslaan. Hy is op die 21-ste dag weer in die hospitaal opgeneem, met vomering en letargie wat in 'n koma oorgegaan het. Laboratoriumtoetse het weer eens verhoogde bloedammoniumvlakke aangetoon (606 $\mu\text{mol/l}$) en 'n aminosuuranalise is vir ondersoek na die moontlikheid van

'n ureumsiklusdefek aangevra. Die aminosuuranalise het verhoogde glisienkonsentrasies in die serum (1.007 mmol/l) getoon, terwyl urinêre glisien en lisien in verhoogde konsentrasies voorgekom het. 'n Organiese suuranalise is op die urien uitgevoer, waar verhoogde konsentrasies van die diagnostiese propioonasidemie-metaboliete gevind is (metielsitroensuur: 288 mmol/mol kreatinien, propionielglisien: 186 mmol/mol kreatinien, 3-hidroksipropioonsuur: 696 mmol/mol kreatinien). Die diagnose is nie met ensiemanalises bevestig nie aangesien die baba met die terugvoer van die diagnose reeds gesterf het.

3.2.1.4 Pasiënt JP

Pasiënt JP is in 1984 as die vierde kind van nie-verwante ouers gebore. Die gesin het reeds twee gesonde kinders. Een vorige baba het in die neonatale periode gesterf nadat hy kliniese simptome van 'n aangebore metaboliese defek getoon het. Geen diagnose is egter verkry nie. Pasiënt JP is in 'n intensiewe sorgeenheid met erge metaboliese asidose, hipotonie, hiperammonemie, trombositopenie, leukopenie en konvulsies op die eerste lewensdag opgeneem. 'n Metaboliese defek is vermoed en 'n organiese suuranalise is aangevra. Hiervolgens is die diagnose van propioonasidemie gemaak (metielsitroensuur: 268 mmol/mol kreatinien, propionielglisien: 16 mmol/mol kreatinien, 3-hidroksipropioonsuur: 179 mmol/mol kreatinien) wat later deur ensiemanalises bevestig is (ongeveer 2% van die ensiemaktiwiteit van kontroles). Ten spyte van peritoneale dialise en 'n lae proteïendieet is baba JP twee maande na geboorte oorlede.

3.2.1.5 Pasiënt KM

KM is in 1984 na 'n normale swangerskap as die vyfde kind van nie-verwante Zoeloe-ouers gebore. Die moeder het vier normale kinders uit twee vorige huwelike gehad. Baba KM het op die derde dag na geboorte met metaboliese asidose, vomering, hipotonie en koma gepresenteer. 'n Metaboliese defek is vermoed en 'n urienmonster is vir 'n ondersoek na die laboratorium verwys. Die diagnose van propioonasidemie is op grond van die teenwoordigheid van verhoogde konsentrasies van die diagnostiese metaboliete gemaak (metielsitroensuur: 300 mmol/mol kreatinien, propionielglisien: 310

mmol/mol kreatinien, 3-hidroksipropioonsuur: 745 mmol/mol kreatinien). Die diagnose is nie met ensiemanalises bevestig nie. KM is met 'n lae-leusienbevattende dieet (S14 Wyeth) en biotien behandel, maar is ten spyte van die behandeling 'n maand na geboorte oorlede.

3.2.1.6 Pasiënt WB

WB is die suster van BB en die tweede kind van die gesin. Die moeder het ongeveer twee jaar na die dood van BB aangedui dat sy swanger was en 'n voorgeboortelike diagnose aangevra. 'n Amnionsintese is op sestien weke van die swangerskap uitgevoer. 'n Voorgeboortelike diagnose deur middel van 'n ensiemanalise is deur dr. W. J. Kleijer van die Erasmus Universiteit, Rotterdam, Nederland uitgevoer. Die aktiwiteit van die propioniel-KoA-karboksilase-ensiem was ongeveer 0.5% van dié van kontrole-amnionselle. Die metielsitroensuurkonsentrasies ($6.62 \mu\text{mol/l}$) in die amnionvog van die moeder was meer as twintigvoudig hoër as die kontrolewaardes ($0.15 - 0.30 \mu\text{mol/l}$). Dit was dus duidelik dat die fetus wel geaffekteer was maar die moeder het ten spyte van die uitslag besluit om die fetus nie te laat aborteer nie. WB is in Junie 1985 gebore. 'n Urienmonster van WB is direk na geboorte verkry en organiese suuranalises is daarop uitgevoer. Hoewel die baba in hierdie stadium nog geen voeding ontvang het nie en die kenmerkende kliniese simptome nog afwesig was, was die meeste van die diagnostiese organiese sure van propioonasidemie reeds in die urien van die pasiënt teenwoordig (metielsitroensuur: 41 mmol/mol kreatinien, propionielglisien: 1 mmol/mol kreatinien, 3-hidroksipropioonsuur: 9 mmol/mol kreatinien). Behandeling met 'n lae-leusienbevattende dieet (S14 Wyeth), karnitien, alanien, natriumbikarbonaat en natriumbensoaat is 'n paar uur na geboorte begin. WB is tans byna nege jaar oud en gaan skool.

3.2.1.7 Pasiënt CA

Pasiënt CA is in 1987 gebore en op die tweede dag na geboorte ontslaan. Sewe dae na geboorte is die baba met geweldige keto- en metaboliese asidose, hiperventilering, hiperammonemie, konvulsies en koma in die hospitaal opgeneem. Ten spyte van dialisebehandeling het die baba dieselfde dag gesterf. 'n Urienmonster is post mortem

verkry omdat 'n aangebore metaboliese defek vermoed is. Die organiese suuranalise het die kenmerkende metabolietprofiel van propioonasidemie vertoon (metielsitroensuur: 324 mmol/mol kreatinien, propionielglisien: 15 mmol/mol kreatinien, 3-hidroksipropioonsuur: 210 mmol/mol kreatinien). Die diagnose is nie met ensiemanalises bevestig nie.

3.2.2 Isovaleriaanasidemie

3.2.2.1 Pasiënt LS

Pasiënt LS ('n seun) het binne 24 uur na geboorte met die simptome van 'n aangebore metaboliese defek gemanifesteer. Hierdie pasiënt het gesterf voordat 'n diagnose gemaak kon word. Isovaleriaanasidemie is post mortem gediagnoseer.

3.2.2.2 Pasiënt HS

Pasiënt HS was die broer van LS. Hy is op 28 November 1987 na 'n normale swangerskap en bevalling as die vierde kind van nie-verwante ouers gebore. Die twee eerste kinders is onderskeidelik een en veertien dae na geboorte oorlede. Isovaleriaanasidemie is post mortem by die tweede kind (LS) gediagnoseer. Die diagnose is deur die laboratorium van prof. S.K. Wadman van die Wilhelmina Kinder Ziekenhuis, Utrecht, Nederland deur ensiemanalises bevestig. Uit die agtergrond van die familiegeskiedenis is pasiënt HS direk na geboorte aan organiese suuranalises onderwerp en isovaleriaanasidemie is op grond van die teenwoordigheid van isovaleriaanglisien en 3-hidroksi-isovaleriaansuur in die urien gediagnoseer.

3.2.3 Glutaarsuururie tipe II

3.2.3.1 Pasiënt BW

Pasiënt BW is na 'n normale swangerskap as die tweede seun van nie-verwante ouers gebore. Die eerste baba van die gesin het in die neonatale periode aan 'n onbekende oorsaak gesterf. BW het twee uur na geboorte tekens van asemnood getoon. Vomering het na voedings voorgekom en bloedgas-analises het tekens van metaboliese asidose

getoon. Hipotonie en hipoglukemie was teenwoordig. Sy urien het 'n vreemde reuk gehad en isovaleriaanasidemie was voorlopig gediagnoseer. 'n Urinêre organiese suuranalise het hoë konsentrasies etielmaloonsuur (52.55 mmol/mol kreatinien), glutaarsuur (1069.2 mmol/mol kreatinien), adapiensuur (66.56 mmol/mol kreatinien), 2-hidroksiglutaarsuur (294.7 mmol/mol kreatinien) en metielsuksiensuur (12.78 mmol/mol kreatinien) getoon. Isovaleriaanglisien en 2-metielbutiriëlglisien was ook in maklik opspoorbare konsentrasies teenwoordig. Volgens die urinêre metabolietprofiel van die organiese sure het die pasiënt glutaarsuururie tipe II gehad. Die diagnose van baba BW is nie met ensiemanalises bevestig nie. Die ouers het 'n voorgeboortelike analise by 'n derde swangerskap aangevra en 'n amnionsintese is op sewentien weke van die swangerskap uitgevoer. Die konsentrasies van glutaaarsuur ($8 \mu\text{mol/l}$) was ongeveer tien keer hoër as die normale konsentrasies. Die vrystelling van $^{14}\text{CO}_2$ deur die amnionselle in die teenwoordigheid van verskeie $1\text{-}^{14}\text{C}$ -substrate het van 14 tot 20% van die waardes van die kontroleselle gewissel (Henderson *et al.*, 1987:589). 'n Aborsie is uitgevoer en ensiemanalises het die diagnose bevestig.

3.2.3.2 Pasiënt MM

Pasiënt MM is 'n bekende volwasse pasiënt met glutaarsuururie tipe II (Dusheiko *et al.*, 1979:1405). 'n Urienmonster van die pasiënt (wat nou reeds oorlede is) is goedgunstiglik deur dr. G. Dusheiko van die Departement Pediatrie aan die Universiteit van die Witwatersrand aan die Departement Biochemie verskaf.

3.2.4 Etielmaloniel-adiapiensuururie

3.2.4.1 Pasiënt MK

MK was die eerste kind van nie-verwante ouers en is na 'n normale swangerskap en bevalling gebore. Die seuntjie het drie dae na geboorte met hipoglukemie, konvulsies en koma voorgedoen. 'n Metaboliese defek is vermoed en 'n urienmonster is vir analises na die laboratorium verwys. Verhoogde urinêre glisienkonsentrasies is deur middel van aminosuuranalises gevind. Organiese suuranalises het verhoogde konsentrasies etielmaloonsuur (883.12 mmol/mol kreatinien), metielsuksiensuur (312 mmol/mol kreatinien)

en adapiensuur (452.8 mmol/mol kreatinien) getoon. Heksanoïelglisien was ook in meetbare konsentrasies teenwoordig. Normale konsentrasies glutaarsuur het voorgekom. Herhaalde urienmonsters het dieselfde metabolietprofiel getoon. Die diagnose van etielmaloniel-adapiensuururie is gemaak maar is nie met ensiemanalises bevestig nie aangesien die ouers nie 'n velbiopsie wou toelaat nie. MK is enkele weke na geboorte oorlede.

3.2.5 2-Metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek

3.2.5.1 Pasiënt T1264

'n Urienmonster van 'n pasiënt met 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek is goedgunstiglik deur prof. S. K. Wadman van die Wilhelmina Kinderziekenhuis, Utrecht, Nederland aan die Departement Biochemie verskaf.

3.3 METODEDES

3.3.1 Ekstraksie van organiese sure

Die ekstraksiemetode is aangepas sodat 'n konstante hoeveelheid organiese sure per hoeveelheid kreatinien uiteindelik altyd vir die GC- en GC-MS-analises gebruik is. Die organiese suurprofiel kon deur middel van hierdie aanpassing met mekaar vergelyk word. Die kreatinieninhoud van die urien is voor die ekstraksie van die organiese sure bepaal. Die pikriensuurmetode (Erasmus, 1987:70) is vir hierdie doel aangewend. Maloonsuur (BDH Chemicals) is as interne standaard gebruik en 2.5 $\mu\text{mol/mg}$ kreatinien van hierdie verbinding is by 1 ml urien gevoeg. Die urien is met 0.2 ml (5 N) HCl aangesuur om 'n pH laer as 2 te verkry. Daar is telkens gekontroleer of die pH wel laer as 2 was. Die urinêre organiese sure is opeenvolgend met etielasetaat (6 ml), diëtieleter (3 ml) en metielasetaat (6 ml) geëkstraheer deur die urien-organiese oplosmiddelmengsel telkens vir 15 minute te skud. Die twee fases is na elke ekstraksie deur middel van sentrifugering geskei en die organiese fases is telkens verwyder en uiteindelik bymekaar gevoeg. Hierdie mengsel is met 'n klein hoeveelheid natriumsulfaat (BDH Chemicals) gedroog. Die natriumsulfaat is deur sentrifugering en dekantering verwyder en die

organiese fases is deur 'n stroom droë stikstof gedroog. Al drie die ekstraksiemiddels is voor gebruik geherdistilleer.

3.3.2 Derivatisering

3.3.2.1 Bereiding van TMS-derivate van organiese sure

Die gedroogde urinêre organiese suurekstrakte is met 22.6 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ kreatinien BSTFA (bis(trimetielsiliel)-trifluoroasetamied) (Sigma Chemical Company) en 4.5 $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$ kreatinien TMCS (trichlorometielsilaan) (Sigma Chemical Company) gederivatieer (gesilaneer). Hiervoor is die mengsel vir veertig minute by 70°C geplaas.

Vir die verkryging van massaspektra en die bepaling van die elueringstyd van organiese suurstandaarde is TMS-derivate van verskillende chemies bereide verbindings (sien 3.5) of van verbindings wat kommersieël verkry is, berei. Vir hierdie doel is 'n konstante hoeveelheid van 10 μg van die organiese suurstandaard en 10 μg van die interne standaard (maloonsuur) met 100 μl BSTFA en 20 μl TMCS gesilaneer.

3.3.2.2 Bereiding van O-geasetileerde-(-)-2-butielesters van organiese sure

O-geasetileerde-(-)-2-butielesters van organiese sure is volgens die metode van Kamerling *et al.* (1981:276) berei. 'n Halwe ml 2-butanol-(1M)-HCl is by 5 mg van die organiese suurstandaard of droë organiese suurekstrak wat volgens die ekstraksiemethode in 3.3.1 geëkstraheer is, gevoeg. Die oplossing is vir twee ure by 100 °C geïnkubeer waarna die oplosmiddel onder vakuum afgedamp is. Die residu is deur middel van 1 ml piridien-asynsuuranhidried (1:1, v/v) vir dertig minute by 100 °C geasetileer. Daarna is die oplosmiddel deur middel van vakuum in die teenwoordigheid van toluen afgedamp. Die gevormde O-geasetileerde-(-)-2-butielesters is in 'n klein hoeveelheid chloroform opgelos waarna dit aan GC-analises onderwerp is.

3.4 ANALITIESE TEGNIEKE

3.4.1 GC-analises van O-geasetileerde- (-)-2- butielesters van organiese sure

Gaschromatografiese analises is op 'n Carlo Erba 4200 gaschromatograaf toegerus met 'n split/splitlose inspuitstuk, vlamionisasiedetektor en 'n SE-30 kapillêre kolom (Fused Silica Kapillarsäule permabond SE-30-DF-0.25 (25 m × 0.32 mm) Macherey-Nagel) uitgevoer. Stikstof (1 ml/minuut) is as draergas gebruik. Die analise het isotermies by 140 °C plaasgevind. Die inspuitstuk en detektor is konstant by 'n temperatuur van 260 °C gelaat. Die gaschromatogram en geïntegreerde piekoppervlaktes is met 'n Spectra-Physics 4270 integreerder verkry.

3.4.2 Gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS)

'n Hewlett Packard 5988A kwadru pool massaspektrometer is vir die GC-MS-analises gebruik. Die massaspektrometer was met 'n Hewlett Packard 5880A gaschromatograaf, 'n elektronionisasie-(EI)-bron en 'n Hewlett Packard 9216-rekenaar toegerus. 'n Ioonbrontemperatuur van 200 °C en elektronenergie van 70eV is vir die verkryging van elektronionisasie-massaspektra gebruik. Die gaschromatograaf was met 'n SE-30 kapillêre kolom (sien 3.4.1), split/splitlose inspuitstuk (250 °C) en 'n direkte GC-MS-koppeling (260 °C) toegerus. Splitlose inspuiting (0.6 µl) is tydens MS-analises gebruik. Helium (1 ml/minuut) is as draergas aangewend. 'n Oondtemperatuur van 60 °C, isotermies vir twee minute, is as aanvangstemperatuur gebruik. Dit is gevolg deur 'n temperatuurstyging van 4 °C/minuut tot by 120 °C waarna die temperatuur teen 10 °C/minuut tot die eindtemperatuur van 280 °C verhoog is. Die maksimumtemperatuur is vir vier minute gehandhaaf.

3.4.3 Berekening van die konsentrasies van organiese sure

Die konsentrasies van die geanaliseerde organiese sure is op die volgende wyse bereken:

'n Unieke ioonfragment is geïdentifiseer en gebruik om responsfaktorwaardes te bepaal. Vir hierdie doel is GC-MS-analises op bekende konsentrasies van standaard van die

betrokke verbindings telkens in die teenwoordigheid van 'n interne standaard uitgevoer. 'n Unieke ioonfragment is gebruik om 'n geselekteerde ioonprofiel te verkry. Die piek is geïntegreer en 'n RF-waarde is uit die geïntegreerde waarde bereken. 'n Integrasiewaarde van die interne standaard is met behulp van die M-15-fragmentioon ([233]⁺) van die interne standaard verkry. Die responsfaktor is deur middel van die volgende formule bereken:

$$RF = \frac{Area\ is}{Area\ S} \times \frac{CCs}{CCis}$$

RF = responsfaktorwaarde

Area IS = integrasiewaarde van interne standaard ([233]⁺)

Area S = integrasiewaarde van standaard

CCs = konsentrasie van standaard

CC is = konsentrasie van interne standaard

3.5 CHEMIESE SINTESEMETODES

3.5.1 Metielsitroensuur

Metielsitroensuur (2-hidroksi-1,2,3-butaantrikarboksielsuur) is volgens die sianohidrienmetode van Beach *et al.* (1977:2702), gewysig volgens Naylor *et al.* (1980:175) berei. Die sintesemetode lewer volgens Beach *et al.* (1977:2702) al vier die stereo-isomere van metielsitroensuur.

3.5.2 3-Metieloksaalasynsuur

Natriumdiëtiel-3-metieloksaalasynsuur is volgens die metode van Cox en McElvain (1937:272) gesintetiseer. Drie-en-twintig gram natrium is in 'n drienekfles onder xileen verpoeier. Die mengsel is afgekoel en die xileen is gedekanteer. Die natrium is twee keer met klein volumes droë eter gewas. Absolute eter (333 ml) is by die natrium gevoeg en die fles is met 'n magneetroerder, reflukskoeler en druptregter toegerus. Die

koeler en druptregter is deur middel van kalsiumchloriedbuis teen vog beskerm. Absolute etanol (58.3 ml) is drupsgewys oor 'n tydperk van vier ure by die natrium-etermengsel gevoeg. Geen ongereageerde natrium was meer na die toevoeging van die etanol teenwoordig nie. Die fles is in 'n ysbad afgekoel en 'n mengsel van 102 g etielpropionaat (Aldrich) en 146 g etieloksaalaat (Aldrich) is drupsgewys oor 'n tydperk van twee uur deur middel van die druptregter by die inhoud van die fles gevoeg. Na toevoeging van die estermengsel is die roerder verwyder en die koeler vir afwaartse distillasie opgestel. Die eter en alkohol wat tydens die reaksie gevorm het is verwyder deur die fles oor 'n waterbad te verhit.

Die gevormde soliede natriumdiëtiel-3-metieloksaalasynsuur is vir die sintese van 3-metieloksaalasynsuur gebruik. Die natriumdiëtiel-3-metieloksaalasynsuur is verskeie kere met warm eter geëkstraheer totdat die oplossing helder gebly het. Vyf gram van die sout is stadig, terwyl dit voortdurend afgekoel is, by 25 ml gekonsentreerde HCl gevoeg. Die fles is dig gesluit en vir 72 uur by kamertemperatuur geskud. Die oplossing is gevriesdroog en die 3-metieloksaalasynsuur-NaCl-mengsel is met warm etielasetaat geëkstraheer. Na droging van die etielasetaat is 10 μg van die produk gesilaneer en 'n GC-MS-analise is uitgevoer soos in 3.4.2 beskryf is.

3.5.3 Dimetielsitroensuur

Dimetielsitroensuur word as byproduk tydens die sintese van metielsitroensuur gevorm.

3.5.4 2,3-Dimetiellappelsuur

2,3-Dimetiellappelsuur (2-hidroksi-2,3-dimetielsuksiensuur) is deur middel van 'n Reformatski-reaksie gesintetiseer. Etiel-2-bromopropionaat (Aldrich) en etielpirovaat (Sigma Chemical Company) is vir die sintese van 2,3-dimetiellappelsuur as uitgangstowwe gebruik. Die reaksie het ongeveer 40% van die verbinding as produk gelewer.

3.5.5 3-Metielappelsuur

3-Metielappelsuur (2-hidroksi-3-metielsuksiensuur) is deur middel van 'n natrium-borohidriedreduksie uit diëtiel-3-metieloksaalasynsuur gesintetiseer. Diëtiel-3-metieloksaalasynsuur (3.5.2) (10 mmol) en natriumborohidried (Sigma Chemical Company) is in 20 ml (2 N) natriumhidroksied opgelos. Die oplossing is vir twee ure by 40 °C verhit. Die oplossing is daarna met 1 N HCl aangesuur om 'n pH < 2 te verkry en met etielasetaat geëkstraheer. Na droging onder vakuum is 10 µg van die produk gesilaneer en 'n GC-MS-analise is daarop uitgevoer (3.4.2).

3.6 *IN VITRO* ENSIEMREAKSIES

3.6.1 Die fumarasereaksie met mesakonsuur as substraat

'n Reaksiemengsel van 3 ml 0.02 M mesakonsuur (Sigma Chemical Company) in 0.04 M fosfaatbuffer (pH 6.8) en 100 µl varkhart-fumarase (10 mg proteïen/ml, 350 eenhede/ml ammoniumsulfaat) (Boehringer Mannheim) is oornag by 37 °C geïnkubeer.

Kontrole

1. Mesakonsuur sonder ensiem.
2. Mesakonsuur met fumaarsuur (Sigma Chemical Company) vervang.

'n Interne standaard (50 µl) (26.25 mg/50 ml maloonsuur) is na inkubasie by die reaksiemengsels gevoeg en die mengsels is tot 'n pH < 2 met 5 N HCl aangesuur. Die produkte van die reaksies is deur middel van die ekstraksiemetode in 3.3.1 geëkstraheer. Die oplosmiddels is deur 'n stroom droë stikstof afgedamp en TMS-derivate is met 20 µl BSTFA en 4 µl TMCS berei soos in 3.3.2.1 beskryf is. GC-MS-analises is op die TMS-derivate uitgevoer (3.4.2).

3.6.2 Die reaksie van asetiel-KoA en 3-metieloksaalasynsuur met sitraatsintetase

'n Reaksiemengsel van 500 μ l 0.1 M Tris-HCl-buffer (pH 8.1) (Boehringer Mannheim), 250 μ l 6 mM asetiel-KoA (Boehringer Mannheim), 100 μ l 200 mM 3-metieloksaalasynsuur (pH 8.1) en 100 μ l 2 mg/ml varkhartsitraatsintetase (Boehringer Mannheim) is saamgestel. Dit is oornag by 37 °C geïnkubeer waarna 100 μ l maloonsuur (26.25 mg/50 ml) by die mengsel gevoeg is en met 5 N HCl tot 'n pH < 2 aangesuur is. Die organiese sure is deur middel van die standaard organiese suurekstraksiemetode geëkstraheer (3.3.1). Na droging onder stikstofgas is die ekstrak met 40 μ l BSTFA en 8 μ l TMCS gesilaneer en aan 'n GC-MS-analise onderwerp (3.4.2). Vir 'n kontrolereaksie is oksaalasynsuur in plaas van 3-metieloksaalasynsuur gebruik.

3.6.3 Die pirovaatkarboksilasereaksie met 2-ketobottersuur en asetiel-KoA as substrate

'n Reaksiemengsel bestaande uit 0.3 ml Tris-HCl (Boehringer Mannheim) (1 M, pH 7.8), 0.095 ml ATP (Sigma Chemical Company) (0.16 mM, pH 8.5), 0.05 ml MgCl₂ (BDH Chemicals) (0.2M), 0.3125 ml KHCO₃ (160 mM, pH 9), 0.5 ml asetiel-KoA (6 mM) (Boehringer Mannheim), 2-ketobottersuur (50 μ M), 100 μ l varkhart-sitraatsintetase (10 mg/ml ammoniumsulfaat, 110 eenhede/mg proteïen) (Boehringer Mannheim) en 200 μ l beeshart-pirovaatkarboksilase (100 eenhede/ml 50% gliserol) is saamgestel. Die reaksiemengsel is oornag by 37 °C geïnkubeer waarna 50 μ l interne standaard (26.25 mg/50ml maloonsuur) bygevoeg is en die mengsel tot 'n pH < 2 aangesuur is. Die organiese sure is agtereenvolgens met etielasetaat (6 ml), diëtieleter (6 ml) en metielasetaat (6 ml) geëkstraheer. Die drie saamgevoegde organiese fases is onder 'n stroom droë stikstof gedroog waarna die droë ekstrak met 20 μ l BSTFA en 4 μ l TMCS vir veerig minute by 70 °C gesilaneer is. 'n GC-MS-analise is uitgevoer, soos in 3.4.2 beskryf is. Vir 'n kontrolereaksie is 2-ketobottersuur met piroviensuur vervang.

HOOFSTUK 4

RESULTATE EN BESPREKING

4.1 INLEIDING

Metielsuksiensuur (3-karboksibottersuur) is 'n bekende verbinding wat in lae konsentrasies in die urien van gesonde persone voorkom (Pettersen & Stokke, 1973:316-321, Nakamura *et al.*, 1976:133). Hierdie metaboliet word soms in baie hoë konsentrasies in die urien van pasiënte met aangebore metaboliese defekte uitgeskei (Hoofstuk 2). Die vorming van metielsuksiensuur word hoofsaaklik aan omega-oksidase (Gregersen, 1985:30, Sweetman, 1989:796, Burlina *et al.*, 1991:1523) en karboksilering van kortkettingvetsure (Gregersen, 1985:33, Vianey-Liaud *et al.*, 1987:182, Sewell *et al.*, 1993:924) toegeskryf, terwyl die reaksies van die Krebs siklus waarskynlik ook tot die vorming daarvan kan bydra (Greter *et al.*, 1980:105). In die geval van isovaleriaanasidemie word metielsuksiensuur uit isovaleriaansuur gevorm, met 4-hidroksiisovaleriaansuur as 'n intermediêr in die reaksie (Truscott *et al.*, 1981:188, Lehnert & Niederhoff, 1981:281-283, Gregersen, 1985:30). Pasiënte met glutaarsuururie tipe II sal, soos in die geval van isovaleriaanasidemie, metielsuksiensuur waarskynlik ook uit hierdie weg kan vorm. 2-Metielbottersuur kan via dieselfde reaksies ook tot die vorming van metielsuksiensuur lei (Goodman *et al.*, 1980:15, Burlina *et al.*, 1991:1523), terwyl bottersuur (Gregersen, 1985:33, Vianey-Liaud *et al.*, 1987:182, Sewell *et al.*, 1993:924) en 2-ketobottersuur (Scrutton *et al.*, 1969:245) onderskeidelik deur propioniel-KoA-karboksilase en pirovaatkarboksilase, aan metielsuksiensuur oorsprong kan gee. Dit is dus duidelik dat 'n verskeidenheid reaksies tot metielsuksiensuur kan lei. Daar is egter geen inligting oor watter isomere van metielsuksiensuur deur die onderskeie reaksies gevorm sal word en of metielsuksiensuur enigsins verder gekataboliseer kan word nie.

Kennis van die isomere wat deur die onderskeie anaboliese reaksies gevorm sal word is belangrik aangesien dit reeds bekend is dat D-metielsuksiensuur suksinaatdehidrogenase inhibeer (Veeger *et al.*, 1969:90), terwyl L-metielsuksiensuur as 'n substraat vir die ensiem kan optree (Truscott *et al.*, 1981:188). Die katabolisme van metielsuksiensuur is in

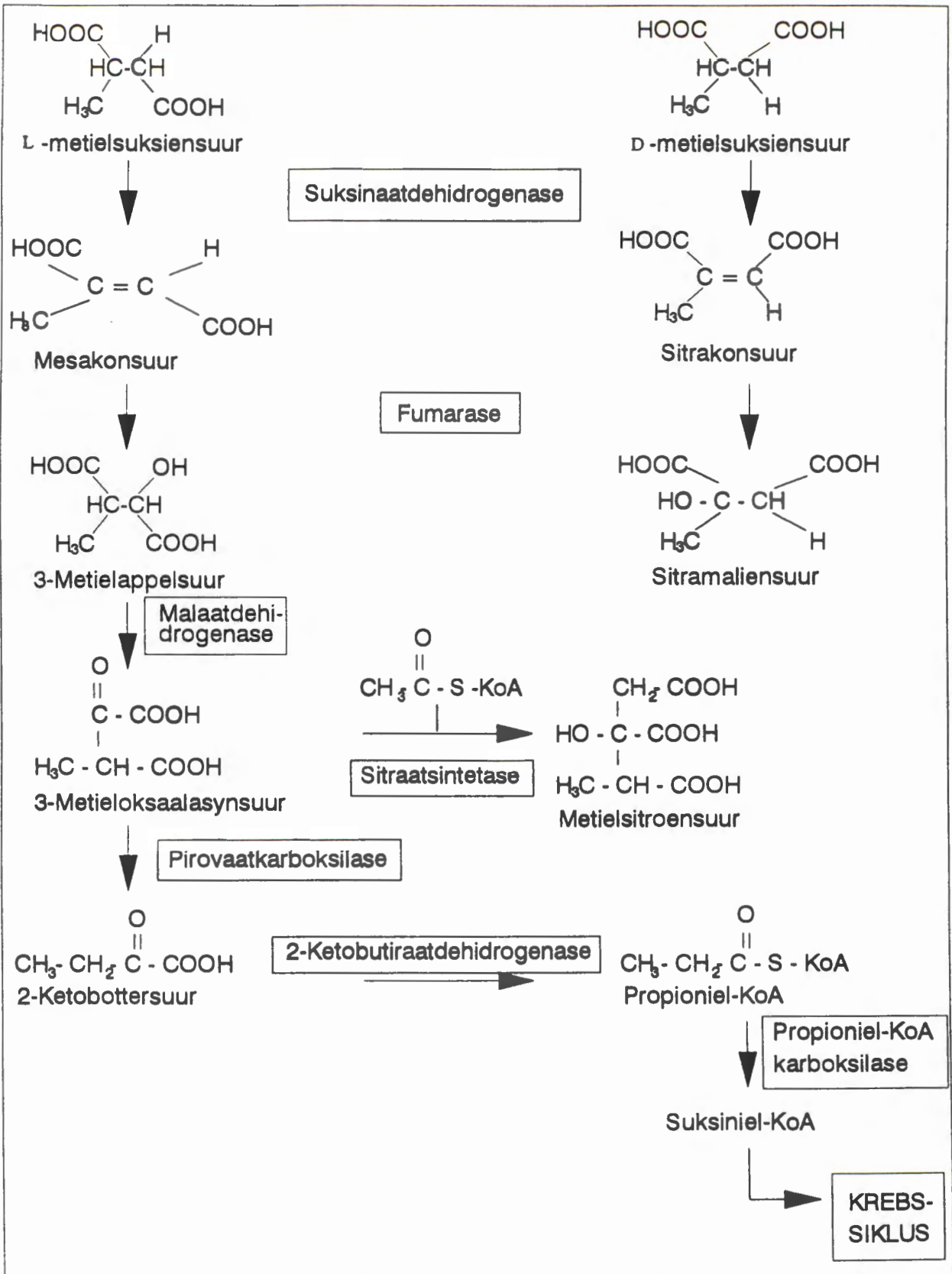
hierdie studie ondersoek. Daar is veral aan L-metielsuksiensuur aandag gegee, hoewel die moontlikheid van die katabolisme van D-metielsuksiensuur ook in die ondersoek betrek is. Soos dit later in die studie sal blyk, kan L-metielsuksiensuur moontlik ook tot die vorming van potensiële inhibeerders lei.

Figuur 4.1 bied 'n voorstelling van 'n moontlike weg wat tot die totale afbraak van metielsuksiensuur sal lei. Indien hierdie voorgestelde weg aktief is en die mens in staat is om metielsuksiensuur volledig af te breek, behoort L-metielsuksiensuur nie enige nadelige effekte te hê nie. Indien dit egter nie volledig gekataboliseer kan word nie, sou van die kataboliese produkte van L-metielsuksiensuur en D-metielsuksiensuur op sigself tot klinies-biochemiese beelde soos hipoglukemie, ketoasidose en hiperammonemie kon bydra.

Soos reeds gestel is, is dit onbekend of enige van die genoemde metaboliese weë tot D- of L- of moontlik selfs beide vorme van metielsuksiensuur kan lei. Dit is egter wel bekend dat metielfumaarsuur (mesakonsuur of *trans*-2-metiel-2-butanedioïensuur) deur isovaleriaanasidemiepatiënte gevorm word (Truscott *et al.*, 1981:187). Aangesien slegs L-metielsuksiensuur as 'n substraat vir suksinaatdehidrogenase kan optree, is dit aanduidend daarvan dat ten minste ván die metielsuksiensuur wat in hierdie pasiënte gevorm word, wel in die L-vorm moet voorkom. Tydens ketoasidose word mesakonsuur in hoë konsentrasies in die urien van hierdie pasiënte aangetref (Truscott *et al.*, 1981:187). Die voorkoms van mesakonsuur dui op 'n stereospesifieke reaksie van suksinaatdehidrogenase met metielsuksiensuur as 'n substraat. Indien hierdie reaksie nie stereospesifiek sou optree nie, sou D-metielsuksiensuur ook as 'n substraat vir die reaksie kon optree en sou sitrakonsuur (*cis*-2-metiel-2-butanedioïensuur) moontlik as 'n produk kon vorm. Die voorkoms van sitrakonsuur in die urien van hierdie pasiënte is volgens my kennis nog nooit beskryf nie. Daar sal egter in hierdie studie deeglik na die moontlike teenwoordigheid van sitrakonsuur ondersoek ingestel word. Hoewel daar geen aanduidings is dat mesakonsuur verder gemetaboliseer kan word nie, het Greter *et al.* (1980:105) die voorkoms van sitramaliensuur in propioonasidemiepatiënte beskryf. Hierdie navorsers het voorgestel dat sitramaliensuur uit metielsitroensuur gevorm word, waartydens metielsuksiensuur as intermediêr gevorm behoort te word. Volgens die

voorstelling behoort mesakonsuur deur fumarase na sitramaliensuur (2-metiel-2-hidroksi-suksiensuur) omvorm te word, in welke geval geen verdere oksidasie deur die bekende ensieme, soos malaatdehidrogenase, moontlik sal wees nie. Hierdie verbinding sou moontlik selfs as 'n inhibeerder van malaatdehidrogenase kon optree, met moontlike ernstige kliniese gevolge. Greter *et al.* (1980:105) het hierdie reaksie egter nie eksperimenteel bewys nie en dit is moontlik dat 3-metielappelsuur as produk van die fumarasereaksie gevorm word. 3-Metielappelsuur, anders as sitramaliensuur (2-metielappelsuur), kan moontlik as 'n substraat vir malaatdehidrogenase optree. Aangesien die fumarasereaksie ook stereospesifiek is (Hill & Teiper, 1971:557), behoort (2S,3R)- of (2S,3S)-metielappelsuur te vorm, hoewel die (2S,3S)-isomeer die mees waarskynlike produk van die reaksie is. Hierdie verbinding sou moontlik as 'n substraat vir malaatdehidrogenase kon optree, met die moontlike vorming van 3-metieloksaalasynsuur. 3-Metieloksaalasynsuur sal waarskynlik soos oksaalasynsuur, spontaan dekarboksileer of 'n moontlike dekarboksileringsreaksie, gekataliseer deur pirovaatkarboksilase, ondergaan met die gevolglike vorming van 2-ketobottersuur (Scrutton *et al.*, 1969:245-246). 2-Ketobottersuur sal volgens die normale katabolisme deur 2-ketobottersuurdehidrogenase na propioniel-KoA omvorm word, wat verder tot suksiniel-KoA afgebreek kan word. Hierdie voorgestelde metaboliese weg kan dus as 'n normale katabolismeweg vir metielsuksiensuur optree indien al die voorgestelde reaksies die korrekte isomere vir die tans bekende ensieme vorm. Om die voorgestelde metaboliese weg in hierdie studie te ondersoek is die volgende benadering gevolg:

Die voorkoms van die verskillende isomere van metielsuksiensuur by isovaleriaan-asedemie, glutaarsuururie tipe II, etielmaloniel-adipiensuururie en propioonasidemie is eerstens ondersoek. Die teenwoordigheid van mesakonsuur, sitrakonsuur, sitramaliensuur, 3-metielappelsuur en verdere moontlike produkte by hierdie pasiënte is voorts ondersoek. Waar moontlik, is *in vitro*-reaksies gebruik om die produksie van sekere van die verbindings te bevestig.



Figuur 4.1 Hipotetiese weg vir die katabolisme van metielsuksiensuur.

4.2 DIE OMVORMING VAN METIELSUKSIENSUUR NA METIELFUMAARSUUR (MESAKONSUUR)

4.2.1 Inleiding en benaderingswyse

Minstens vier geïnduseerde metaboliese weë het die potensiaal om aan metielsuksienuur oorsprong te gee. Die bekendste van hierdie weë vind deur karboksilering van butiriel-KoA deur propioniel-KoA-karboksilase plaas. Etielmaloniel-KoA word as produk van hierdie reaksie gevorm, wat deur metielmaloniel-KoA-isomerase na metielsuksienuur omvorm word (Sewell *et al.*, 1993:924). Hierdie weg is hoofsaaklik vir die vorming van metielsuksienuur in etielmaloniel-adipiensuururie verantwoordelik (Mantagos *et al.*, 1979:1586) en is een van minstens drie moontlike anaboliese weë vir metielsuksienuur in glutaarsuururie tipe II (Goodman *et al.*, 1980:15).

Die tweede geïnduseerde anaboliese weg vir metielsuksienuur geskied deur ω -oksidase van twee moontlike substrate, naamlik 4-hidroksi-isovaleriaansuur en 2-metielbottersuur. Isovaleriaansuur, 'n intermediêr in die leusienkatabolismeweg, word deur ω -hidroksilering na 4-hidroksi-isovaleriaansuur omvorm. Hierdie produk kan dan deur verdere oksidase aan metielsuksienuur oorsprong gee. Die weg funksioneer in isovaleriaanasidemie (Truscott *et al.*, 1981:188) en kan waarskynlik ook in glutaarsuururie tipe II tot die vorming van metielsuksienuur bydra (Goodman *et al.*, 1980:15). Metielsuksienuur kan deur ω -oksidase van 2-metielbottersuur in propioonasidemie, glutaarsuururie tipe II en 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek gevorm word. 2-Metielbottersuur is 'n intermediêr in die isoleusienkatabolismeweg en lewer metielsuksienuur via 4-hidroksi-2-metielbottersuur (Burlina *et al.*, 1991:1523).

Die derde moontlike weg waaruit metielsuksienuur kan ontstaan verloop deur die Krebs siklus. Dié weg is deur Greter en medewerkers (1980:105) voorgestel. Hierdie navorsers het hoë konsentrasies sitramaliensuur in die urien van propioonasidemie-pasiënte gevind en voorgestel dat dit van metielsitroensuur afkomstig kan wees. Hierdie voorstelling impliseer dat metielsuksienuur as tussenproduk in die reaksie gevorm word. Daar bestaan egter nog geen eksperimentele gegewens wat hierdie voorstel kan steun nie.

Die vierde moontlike weg wat metielsuksiensuur kan lewer word deur karboksilering van 2-ketobottersuur deur pirovaatkarboksilase geïnduseer (Scrutton *et al.*, 1969:245). Hierdie weg sou via 3-metieloksaalasynsuur aan metielsuksiensuur oorsprong kon gee.

Daar is in hierdie gedeelte van die studie gepoog om vas te stel watter isomere van metielsuksiensuur moontlik deur die verskillende geïnduseerde weë gevorm word. Die identiteit van die isomere wat gevorm word, kan bepaal of metielsuksiensuur gekataboliseer sal word aldan nie aangesien D-metielsuksiensuur 'n inhibeerder van suksinaatdehidrogenase is, terwyl L-metielsuksiensuur as 'n substraat vir die ensiem kan optree.

Die volgende benadering is hier gevolg:

Metielsuksiensuur kom in hoë konsentrasies in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie voor (tot 800 mmol/mol kreatinien) (Truscott *et al.*, 1981:197). Dit word waarskynlik deur ω -oksidase van 4-hidroksi-isovaleriaansuur gevorm. Mesakonsuur is ook in hoë konsentrasies in die urien van hierdie pasiënte teenwoordig (tot 500 mmol/mol kreatinien) (Truscott *et al.*, 1981:197). Laasgenoemde produk ontstaan waarskynlik deur dehidrogenering van metielsuksiensuur deur suksinaatdehidrogenase. Daar kan dus met 'n redelike mate van sekerheid aanvaar word dat minstens 'n gedeelte van die metielsuksiensuur wat via 4-hidroksi-isovaleriaansuur gevorm word, die L-isomeer van die verbinding is. Die reaksie sou moontlik selfs uitsluitlik L-metieluksiensuur kon produseer.

Pasiënte met etielmaloniel-adipiensuururie produseer ook groot hoeveelhede metielsuksiensuur, wat hoofsaaklik 'n produk van karboksilering van butiriel-KoA is (Mantagos *et al.*, 1979:1586). Dit is nog nie bekend of hierdie pasiënte ook hoë konsentrasies mesakonsuur produseer nie. Die teenwoordigheid of afwesigheid van mesakonsuur in die urien van hierdie pasiënte sou dus kon aandui watter isomere van metielsuksiensuur deur karboksilering van butiriel-KoA gevorm word.

Die teenwoordigheid of afwesigheid van mesakonsuur in die urien van pasiënte met propioonasidemie, 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek en glutaarsuururie tipe II

behoort dus ook aan te dui watter isomere van metielsuksiensuur uit 2-metielbottersuur gevorm word.

4.2.2 Resultate

4.2.2.1 Die teenwoordigheid van metielsuksiensuur en mesakonsuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, etielmaloniel-adipiensuururie, glutaarsuururie tipe II, 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek en propioonasidemie.

Urienmonsters van pasiënte met isovaleriaanasidemie, etielmaloniel-adipiensuururie, glutaarsuururie tipe II, 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek en propioonasidemie is aan organiese suurekstraksies (3.3.1), vorming van TMS-derivate (3.3.2.1) en GC-MS-analises (3.4.2) onderwerp. Die konsentrasies van die urinêre metielsuksiensuur en mesakonsuur is bepaal soos in 3.4.3 beskryf is.

Die massaspektra van metielsuksiensuur-di-TMS en mesakonsuur-di-TMS is reeds gepubliseer en is vir die identifisering van hierdie verbindings in die urien van die pasiënte gebruik. Die urinêre konsentrasies van metielsuksiensuur en mesakonsuur word in Tabel 4.1 getoon. Die kliniese en biochemiese besonderhede van die pasiënte wat in die studie gebruik is, is reeds in Hoofstuk 3 bespreek.

Tabel 4.1 Konsentrasies (mmol/mol kreatinien) van metielsuksiensuur en mesakonsuur in die urien van pasiënte met verskillende aangebore metaboliese defekte

Pasiënt	Diagnose	Metielsuksiensuur	Mesakonsuur
LS	Isovaleriaanasidemie	6.1	2.8
HS1	Isovaleriaanasidemie	9.4	3.1
HS2	Isovaleriaanasidemie	24.3	2.0
HS3*	Isovaleriaanasidemie	121.8	68.1
HS4*	Isovaleriaanasidemie	134.3	74.2
MK	Etielmaloniel-adipiensuururie	369.5	138.0

BW1	Glutaarsuururie tipe II	20.6	Spoor
BW2	Glutaarsuururie tipe II	8.5	Spoor
BW3	Glutaarsuururie tipe II	24.3	Spoor
MM	Glutaarsuururie tipe II	58.2	1.14
T1264	2-Metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek	16.2	Afwesig
ML1	Propioonasidemie	Afwesig	Afwesig
ML2	Propioonasidemie	4.9	Afwesig
EK	Propioonasidemie	Afwesig	Afwesig
BB*	Propioonasidemie	4.1	3.5
JP	Propioonasidemie	3.1	Afwesig
KM*	Propioonasidemie	10.9	Spoor
WB1	Propioonasidemie	1.02	Afwesig
WB2	Propioonasidemie	2.8	Afwesig
Kontrole (n=10)	Gesonde persone	0 - 2.6	Afwesig

* Hierdie pasiënte was ketoties tydens versameling van die urienmonsters.

4.2.3 Bespreking

Die metielsuksiensuur in die urien van die isovaleriaanasidemiepasiënte was nie so hoog soos in die geval van Truscott *et al.* (1981:197) se pasiënt nie. Soos in die geval van bogenoemde navorsers se studie, was daar egter heelwat hoër konsentrasies metielsuksiensuur by die pasiënte wat tydens die versameling van die urien ketoties was, teenwoordig. Daar was ook 'n duidelike verband tussen die konsentrasies van metielsuksiensuur en mesakonsuur. Soos in die geval van Truscott *et al.* (1981:197) se ondersoek, was die konsentrasies van mesakonsuur ook ongeveer 50% van die konsentrasies van metielsuksiensuur. Dit blyk dus uit hierdie resultate dat die L-isomeer van metielsuksiensuur by hierdie pasiënte gevorm word of dat minstens 'n gedeelte van die metielsuksiensuur die L-isomeer is. Hierdie resultate impliseer verder dat ω -oksidatie van 4-hidroksi-isovaleriaansuur L-metielsuksiensuur as produk lewer, hoewel die

moontlikheid nie uitgesluit is dat D-metielsuksiensuur ook deur hierdie reaksie gevorm kan word nie.

Hoë konsentrasies metielsuksiensuur (370 mmol/mol kreatinien) het by die etielmaloniel-adipiensuururie pasiënt voorgekom. Die konsentrasies van mesakonsuur was hier ook ongeveer 50% van die metielsuksiensuurkonsentrasies. Dit wil dus hiervolgens voorkom of karboksilering van butiriel-KoA ook aan L-metielsuksiensuur oorsprong gee.

In teenstelling met die vorige twee groepe pasiënte was daar slegs spoorhoeveelhede mesakonsuur by die meeste glutaarsuururie tipe II-pasiënte teenwoordig. Daar word dus oënskynlik D-metielsuksiensuur by hierdie pasiënte gevorm. Aangesien meer as een weg in glutaarsuururie tipe II aan metielsuksiensuur oorsprong kan gee, kan 'n spesifieke weg nie as die produseerder van D-metielsuksiensuur uitgesonder word nie.

Die konsentrasies van metielsuksiensuur in die pasiënte met propioonasidemie en 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek was gering tot matig verhoog (1.02 tot 16.2 mmol/mol kreatinien). Mesakonsuur was by hierdie pasiënte afwesig, behalwe in die geval van BB, wat geweldig ketoties was (3-hidroksibottersuurkonsentrasies > 1 000 mmol/mol kreatinien). Indien BB se resultate nie in ag geneem sou word nie, blyk dit dat D-metielsuksiensuur uit 2-metielbottersuur gevorm word. Aangesien BB 'n mesakonsuurkonsentrasie van meer as 50% van die metielsuksiensuurkonsentrasie uitgeskei het is dit moontlik dat mesakonsuur in hierdie geval uit die omgekeerde reaksies van die Krebs siklus kon ontstaan, met ander woorde mesakonsuur sou dan eerste gevorm word en dan aan metielsuksiensuur oorsprong gee.

Dit blyk uit die resultate van hierdie analyses dat die benadering wat in 4.2.1 gevolg is nie met duidelike sekerheid kan aantoon watter isomere van metielsuksiensuur deur die verskillende anaboliese weë gevorm word nie.

Dit was vir die doel van hierdie studie noodsaaklik om die absolute identiteit van die isomere van metielsuksiensuur in die urien van die pasiënte vas te stel, veral in die lig van Greter *et al.* (1980:105) se bevinding dat hoë konsentrasies sitramaliensuur in die

urien van propioonasidemiepatiënte uitgeskei word. Hierdie verbinding sou moontlik uit die katabolisme van metielsuksiensuur kon ontstaan in welke geval dit sou beteken dat die L-isomeer ter sprake is.

Om dus spesifiek vas te stel watter isomere van metielsuksiensuur deur die onderskeie anaboliese weë, naamlik karboksilering van butiriel-KoA deur propioniel-KoA-karboksilase, karboksilering van 2-ketobottersuur deur pirovaatkarboksilase en ω -oksidase van onderskeidelik 4-hidroksi-isovaleriaansuur en 2-metielbottersuur gevorm word, was dit nodig om die stereo-isomere van metielsuksiensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, propioonasidemie, etielmaloniel-adipiensuururie en glutaarsuururie tipe II te bepaal. Hierdie resultate sou kon aandui of die voorgestelde kataboliese weg vir metielsuksiensuur (Figuur 4.1) wel sou kon bestaan.

4.2.4 Bepaling van die isomere van metielsuksiensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie en propioonasidemie

4.2.4.1 Benaderingswyse

Verskeie metaboliese weë dra in glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie tot die vorming van metielsuksiensuur by (Goodman *et al.*, 1980:15, Gregersen *et al.*, 1982:867, Burlina *et al.*, 1991:1523). In etielmaloniel-adipiensuururie word metielsuksiensuur hoofsaaklik deur karboksilering van butiriel-KoA gevorm (Mantagos *et al.*, 1979:1586). Glutaarsuururie tipe II-pasiënte kan metielsuksiensuur deur karboksilering van butiriel-KoA en ω -oksidase van 4-hidroksi-isovaleriaansuur en 2-metielbottersuur onderskeidelik, vorm (Goodman *et al.*, 1980:15). Laasgenoemde twee weë sou ook tot 'n mindere mate in etielmaloniel-adipiensuururie aktief kon wees. Aangesien die metaboliese weë wat in glutaarsuururie tipe II tot metielsuksiensuur lei ook in propioonasidemie en isovaleriaanasidemie aktief is, is hierdie defek nie verder in hierdie gedeelte van die studie betrek nie. Die pasiënte met glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie het ook kort na die diagnose gesterf en urienmonsters kon nie vir verdere analyses versamel word nie.

Indien ω -oksidasie stereospesifiek sou plaasvind sou slegs een isomeer van metielsuksiensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie teenwoordig wees. Dit is selfs moontlik dat hierdie reaksie uitsluitlik L-metielsuksiensuur produseer. Hoë konsentrasies metielsuksiensuur word in die urien van isovaleriaanasidemiepasiënte uitgeskei, wat die ondersoek vergemaklik het.

2-Metielbottersuur kan ook deur ω -oksidasie aan metielsuksiensuur oorsprong gee (Goodman *et al.*, 1980:15). Hierdie weg funksioneer waarskynlik in propioonasidemie. Metielsuksiensuur kan ook moontlik deur karboksilering van 2-ketobottersuur (Scrutton *et al.*, 1969:245) en oksidasie van metielsitroensuur deur die Krebs siklus (Greter *et al.*, 1980:105) onderskeidelik, by hierdie pasiënte gevorm word. 'n Ondersoek na die stereoisomere in die urien van die isovaleriaanasidemiepasiënte sou dus 'n meer betroubare resultaat ten opsigte van die isomere wat deur ω -oksidasie gevorm word, lewer. Indien daar dus slegs een isomeer van metielsuksiensuur in isovaleriaanasidemie teenwoordig sou wees, kan verwag word dat ω -oksidasie van 2-metielbottersuur ook tot slegs 'n enkele isomeer sal lei.

4.2.4.2 Resultate

Met die doel om te bepaal watter stereo-isomere van metielsuksiensuur in die urien van die pasiënte met isovaleriaanasidemie en propioonasidemie voorkom, is die absolute konfigurasie van die verbinding met behulp van 'n standaard (D,L-metielsuksiensuur) bepaal. Die GC-metode wat vir 2-hidroksidikarboksielsure beskryf is (Kamerling *et al.*, 1981:276), is vir die ondersoek gebruik.

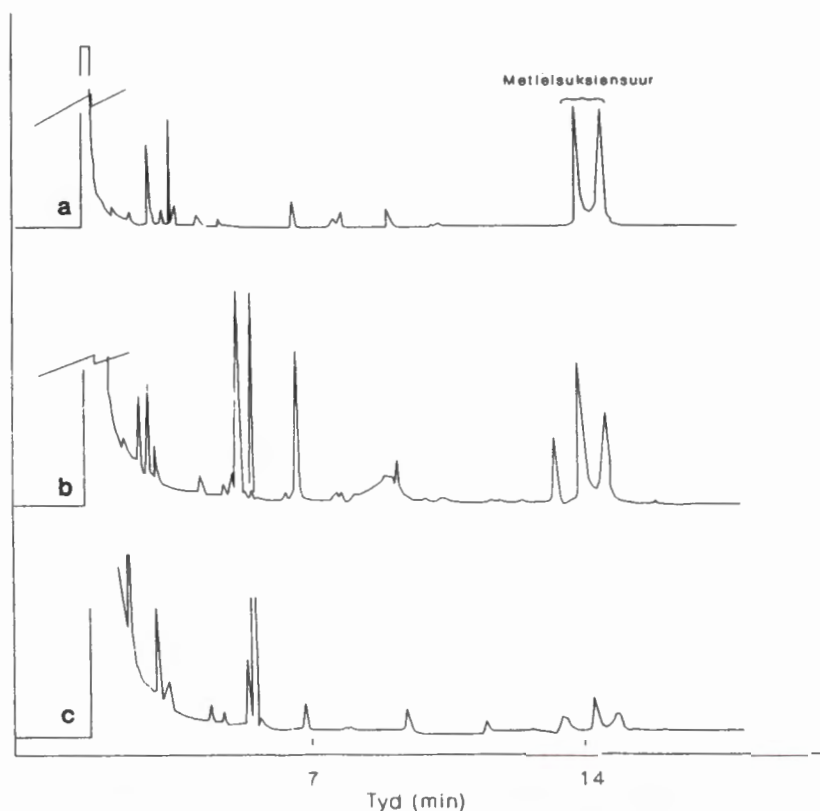
Na ekstraksie van die organiese sure (3.3.1) is (-)-(2)-butielesters van die enantiomere van metielsuksiensuur berei soos in 3.3.2.2 beskryf is. GC-analises is uitgevoer soos in 3.4.1 beskryf is.

Die twee butielesters het onderskeidelik op die tye 14.034 en 14.246 minute geëluëer (Figuur 4.2a). Die analises van die isovaleriaanasidemiepasiënte se urien het variërende resultate gelewer. Beide isomere van metielsuksiensuur was in al die urienmonsters

teenwoordig. By sommige pasiënte was die isomeer wat tweede geëlueer het egter in baie laer konsentrasies as die isomeer wat eerste geëlueer het teenwoordig (Figuur 4.2b). In ander urienmonsters was die isomere in byna ekwimolekulêre hoeveelhede teenwoordig.

Beide isomere was in lae konsentrasies in die urien van die propioonasidemiepasiënte teenwoordig. Die isomeer wat tweede geëlueer het was by hierdie pasiënte altyd in baie laer konsentrasies as die isomeer wat eerste geëlueer het, teenwoordig (Figuur 4.2c).

Die absolute identiteit van die isomere wat onderskeidelik eerste en tweede geëlueer het is nie bekend nie en kon nie bepaal word nie, maar aangesien beide isomere in hoë konsentrasies in die urien van sommige isovaleriaanasidemiepasiënte teenwoordig was, wil dit voorkom of ω -oksidatie van 4-hidroksi-isovaleriaansuur nie stereospesifieke produkte lewer nie. Daar kan dus verwag word dat ω -oksidatie van 2-metielbottersuur ook nie stereospesifiek sal plaasvind nie.



Figuur 4.2 GC-profiel van: (a) di-(-)-2-butielesters van (D,L)-metielsuksiensuur (standaard); (b) di-(-)-2-butielesters van metielsuksiensuur in die urien van die isovaleriaanasidemiepasiënte; (c) di-(-)-2-butielesters van metielsuksiensuur in die urien van die propioonasidemiepasiënte.

4.2.5 Bespreking

Beide isomere van metielsuksiensuur was in die urien van die pasiënte met isovaleriaanasidemie sowel as propioonasidemie teenwoordig. Volgens isovaleriaanasidemie se resultaat vind ω -oksidase van 4-hidroksi-isovaleriaansuur oënskynlik nie stereospesifiek plaas nie. Daar bestaan dan verder geen rede om te glo dat ω -oksidase van 2-metielbottersuur 'n ander tendens sal toon nie. Gevolglik word aanvaar dat hierdie reaksie ook nie stereospesifiek plaasvind nie.

Die D-isomeer sal waarskynlik nie verder gekataboliseer word nie en word moontlik uitgeskei. Die L-isomeer kan verder tot mesakonsuur gedehidrogeneer word. Aangesien die isomeer wat eerste tydens die GC-analise geëlueer het in sommige urienmonsters in baie hoër konsentrasies as die isomeer wat eerste geëlueer het teenwoordig was, is dit moontlik dat eersgenoemde die D-isomeer van die verbinding is. Die L-isomeer sal dan in laer konsentrasies teenwoordig wees aangesien dit verder gekataboliseer kan word.

4.3 'N ONDERSOEK NA DIE TEENWOORDIGHEID VAN SITRAKONSUUR IN DIE URIEN VAN PASIËNTE MET ISOVALERIAANASIDEMIE EN PROPIOONASIDEMIE

4.3.1 Motivering

Daar is reeds in 4.2.4 aangetoon dat D- en L-metielsuksiensuur in die urien van hierdie pasiënte teenwoordig is. Indien die L-isomeer na mesakonsuur omvorm word bestaan die moontlikheid dat die D-isomeer na sitrakonsuur (*cis*-2-metiel-2-butanedioïensuur) omvorm kan word. Daar is reeds in die studie aangetoon dat D-metielsuksiensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie teenwoordig is en die teenwoordigheid van sitrakonsuur sou dus die moontlike omvorming van D-metielsuksiensuur kon aantoon.

4.3.2 Resultate

Urienmonsters van die pasiënte in 4.2.4 is aan organiese suurekstraksies (3.3.1), derivatisering (3.3.2.1) en GC-MS-analises (3.4.2) onderwerp. Kommersiële mesakonsuur

4.3.3 Bespreking

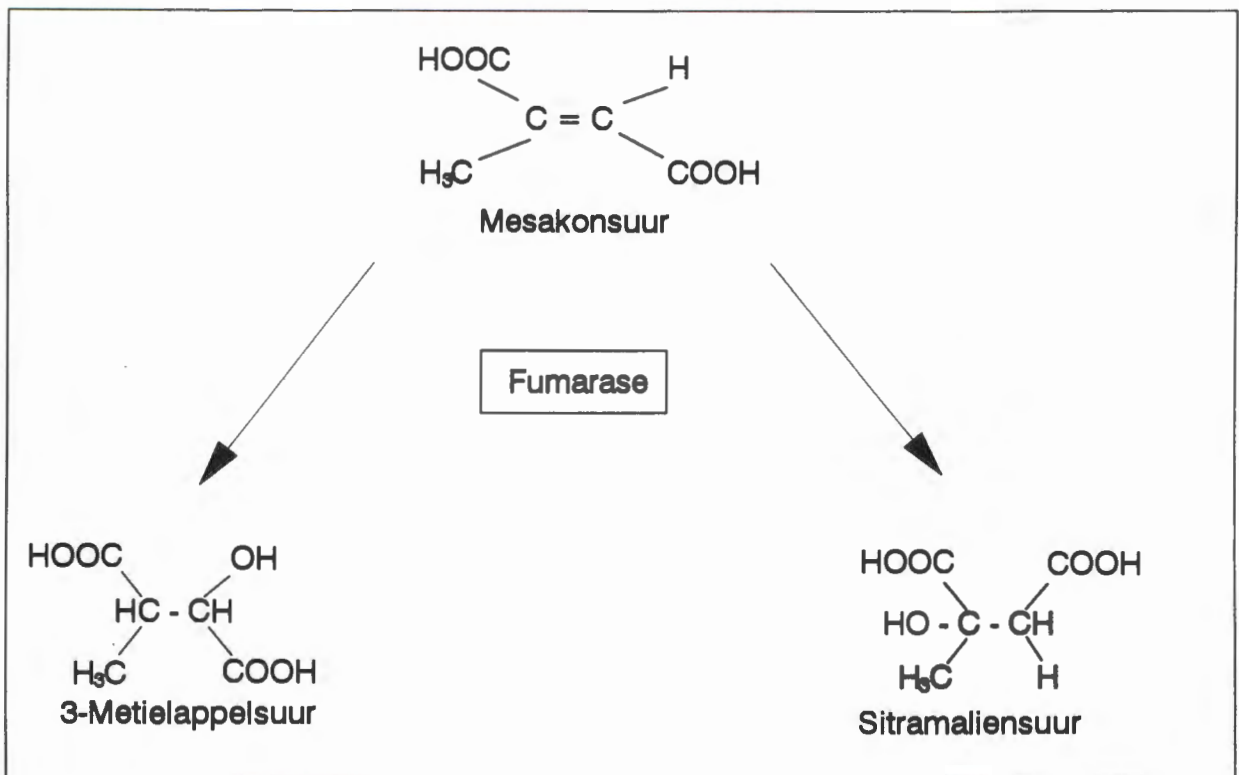
Hierdie eksperiment het aangetoon dat geen sitrakonsuur in die urien van pasiënte met isovaleriaan- en propioonasidemiepasiënte teenwoordig is nie. D-metielsuksiensuur kan dus nie verder gekataboliseer word nie of indien dit verder gekataboliseer word, word sitrakonsuur nie as 'n produk gevorm nie. Dit is te wagte aangesien dit bekend is dat suksinaatdehidrogenase deur D-metielsuksiensuur geïnhibeer word. Die ideaal sou wees om in 'n *in vitro*-reaksie met D-metielsuksiensuur en suksinaatdehidrogenase vas te stel of sitrakonsuur gevorm word of nie. Dit sou egter nie moontlik wees nie aangesien suksinaatdehidrogenase 'n membraanproteïen en deel van die elektrontransportketting is, wat nie in 'n aktiewe vorm isoleerbaar is nie. D-metielsuksiensuur is ook nie kommersieël verkrygbaar nie.

4.4 DIE PRODUK VAN FUMARASE MET MESAKONSUUR AS 'N SUBSTRAAT

4.4.1 Motivering

Dit is moontlik dat mesakonsuur as 'n substraat vir fumarase kan optree. Twee moontlike produkte, naamlik sitramaliensuur en 3-metielappelsuur sou deur hierdie reaksie gevorm kon word (Figuur 4.4). Greter *et al.* (1980:105) het hoë konsentrasies sitramaliensuur in die urien van propioonasidemiepasiënte aangetoon en voorgestel dat dit uit metielsitroensuur deur die Krebs-siklus gevorm sou kon word. Hierdie voorstelling impliseer dat metielsuksiensuur en mesakonsuur as intermediêre in die reaksie gevorm word en dat sitramaliensuur die produk van fumarase met mesakonsuur as 'n substraat sou kon wees. Hierdie navorsers het die voorgestelde weg egter nie eksperimenteel bewys nie en daar kan nie sonder meer aanvaar word dat sitramaliensuur wel die produk van fumarase met mesakonsuur as 'n substraat is nie.

Die teenwoordigheid van 3-metielappelsuur in urien, is sover uit die literatuur vasgestel kon word, nog nie beskryf nie hoewel die moontlikheid bestaan dat dit wel deur die bogenoemde reaksie gevorm kan word.



Figuur 4.4 Die voorgestelde reaksie vir die produkte van fumarase met mesakonsuur as 'n substraat.

4.4.2 Benaderingswyse

Indien sitramaliensuur of 3-metielappelsuur deur fumarase met mesakonsuur as 'n substraat gevorm word, sal hoë konsentrasies van hierdie produkte in die urien van isovaleriaanasidemie pasiënte en moontlik ook etielmaloniel-adipiensuururie verwag word aangesien hoë konsentrasies mesakonsuur by hierdie pasiënte voorkom. Die teenwoordigheid van laasgenoemde verbinding is nog nie voorheen by hierdie defekte beskryf nie. Dit was in hierdie gedeelte van die studie moontlik om 'n aanduiding van die geldigheid van die hipotetiese weg te verkry deur vas te stel of sitramaliensuur of 3-metielappelsuur in die urien van die pasiënte teenwoordig is.

4.4.3 Die teenwoordigheid van sitramaliensuur in die urien van pasiënte met propioonasidemie, isovaleriaanasidemie en etielmaloniel-adipiensuururie

4.4.3.1 Resultate

Organiese suurekstraksies (3.3.1) en vorming van TMS-derivate (3.3.2.1) is op die urienmonsters uitgevoer en die konsentrasies van metielsuksiensuur, mesakonsuur en sitramaliensuur is deur middel van GC-MS-analises (3.4.2 en 3.4.3) bepaal. Die massaspektrum van die TMS-derivaat van kommersiële sitramaliensuur is as standaard in die ondersoek gebruik. Sitramaliensuur-tri-TMS het op 20.104 minute geëlueer en het 'n massa van 364 massa-eenhede wat deur die M-15-ioonfragment van [349]⁺ aangedui word. Die verbinding word ook deur 'n prominente [247]⁺ ioonfragment gekenmerk asook deur die [233]⁺-ioonfragment wat in lae intensiteit voorkom. Die massaspektrum word in Figuur 4.8 getoon. Die konsentrasies van die urinêre metaboliete word in Tabel 4.2 getoon.

Tabel 4.2 Konsentrasies (mmol/mol kreatinien) van metielsuksiensuur, mesakonsuur en sitramaliensuur in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, etielmaloniel-adipiensuururie en propioonasidemie.

Pasiënt	Diagnose	Metielsuksiensuur	Mesakonsuur	Sitramaliensuur
LS	Isovaleriaanasidemie	6.1	5.8	1.6
HS1	Isovaleriaanasidemie	9.4	3.1	1.7
HS2	Isovaleriaanasidemie	24.3	2.0	3.0
HS3*	Isovaleriaanasidemie	121.8	68.1	Spoor
HS4*	Isovaleriaanasidemie	134.3	74.2	Spoor
MK	Etielmaloniel-adipiensuururie	369.5	24.3	10.2
ML2	Propioonasidemie	4.9	Afwesig	Afwesig

EK	Propioonasidemie	Afwesig	Afwesig	2.8
BB*	Propioonasidemie	4.1	3.5	206.28
JP	Propioonasidemie	3.1	Afwesig	1.7
KM*	Propioonasidemie	10.9	Spoor	9.3
Kontrole (n = 10)	Gesonde persone	0 - 2.6	Afwesig	Spoor

* Ketoties tydens versameling van die urienmonster.

4.4.3.2 Bespreking

Sitramaliensuur was deurgaans in die urien van die pasiënte teenwoordig. Die meeste pasiënte het hoër konsentrasies sitramaliensuur as gesonde persone uitgeskei (Tabel 4.2), wat moontlik deur die vorming van sitramaliensuur uit mesakonsuur verklaar kan word. Dit is egter duidelik dat daar hoegenaamd geen verband tussen die konsentrasies van sitramaliensuur en mesakonsuur bestaan nie.

Die oorsprong van sitramaliensuur is dus steeds onbekend hoewel dit moontlik is dat in die lig van die konsentrasies van mesakonsuur en sitramaliensuur in isovaleriaanasidemie en etielmaloniel-adipiensuururie, daar tog 'n klein hoeveelheid sitramaliensuur in hierdie pasiënte van die fumarasereaksie met mesakonsuur as 'n substraat afkomstig mag wees.

Die resultate in Tabel 4.2 toon egter aan dat sitramaliensuur hoofsaaklik uit 'n ander weg gevorm word. Daar sal later in die studie na ander moontlike anaboliese weë vir sitramaliensuur ondersoek ingestel word (4.8).

Sitramaliensuur sal weens sy struktuur nie verder deur die bekende ensieme soos malaatdehidrogenase, verder gekataboliseer kan word nie en daar is dus nie verder na die katabolisme van hierdie verbinding ondersoek ingestel nie.

4.5 DIE TEENWOORDIGHEID VAN 3-METIELAPPELSUUR IN DIE URIEN VAN PASIËNTE MET ISOVALERIAANASIDEMIE EN PROPIOONASIDEMIE

4.5.1 Benaderingswyse

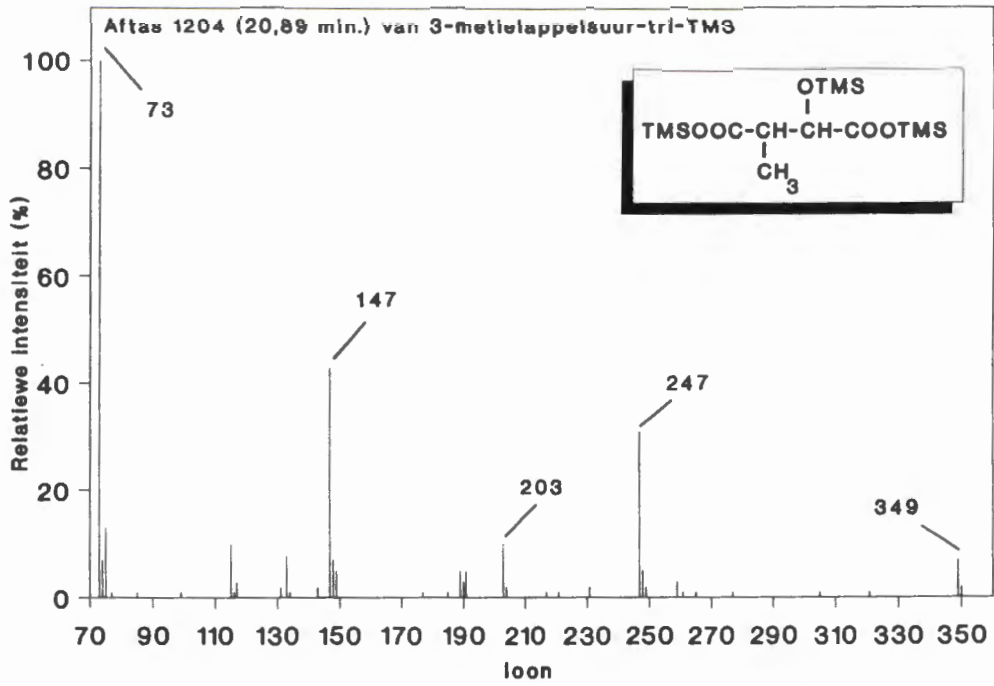
Indien 3-metielappelsuur die produk van fumarase met mesakonsuur as 'n substraat is behoort hoë konsentrasies daarvan in die urien van isovaleriaanasidemiepatiënte teenwoordig te wees omdat hoë konsentrasies mesakonsuur by hierdie pasiënte gevind word. Daar word nie groot hoeveelhede 3-metielappelsuur by propioonasidemie verwag nie aangesien min mesakonsuur deur hierdie pasiënte gevorm word. Urienmonsters van die isovaleriaanasidemie- en propioonasidemiepatiënte is vir die teenwoordigheid van 3-metielappelsuur ondersoek.

4.5.2 Resultate en bespreking

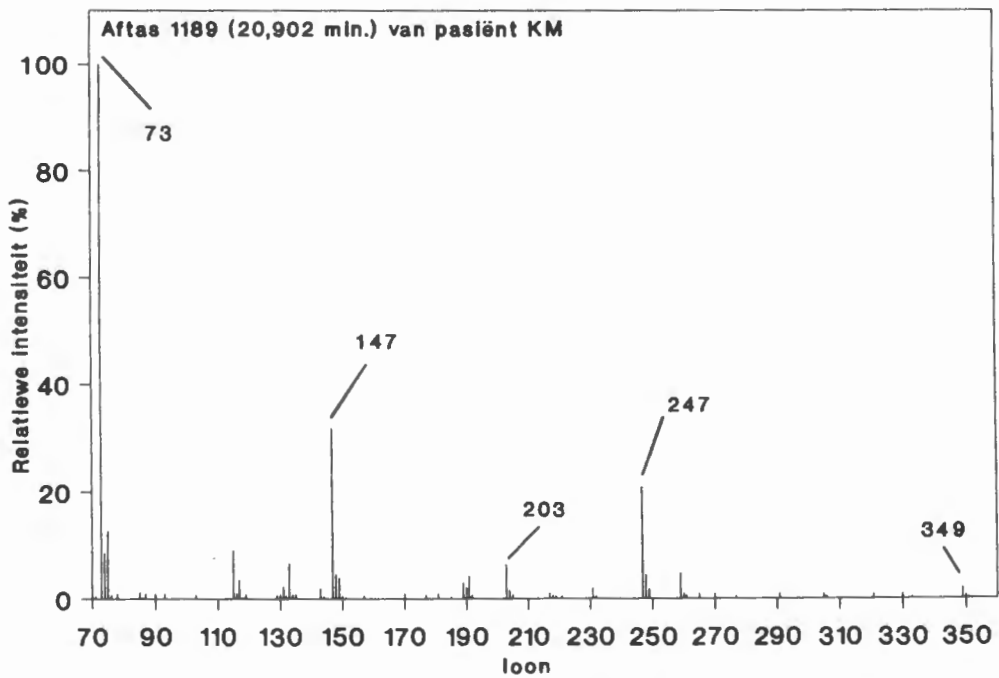
3-Metielappelsuur is chemies berei soos in 3.5.5 beskryf is. Dit is aan dieselfde ekstraksie- en derivatiseringsprosedures (3.3.1 en 3.3.2.1) as die urienmonsters onderwerp. GC-MS-analises is op die verbinding uitgevoer (3.4.2) en die verkrygte massaspektrum het as standaard in die ondersoek gedien. Die massaspektrum van die chemies bereide 3-metielappelsuur-tri-TMS word in Figuur 4.5 getoon. Die verbinding het op 'n retensietyd van 20.89 minute geëlueer. Dit het soos sitramaliensuur-tri-TMS 'n massa van 364 massa-eenhede, wat deur die $[349]^+$ (M-15)-ioonfragment aangedui word. 'n Prominente $[247]^+$ -ioonfragment is kenmerkend asook 'n $[203]^+$ -ioonfragment wat in 'n lae intensiteit voorkom.

Die urienmonsters is ook aan organiese suurekstraksies (3.3.1) en derivatisering (3.3.2.1) onderwerp en GC-MS-analises is daarop uitgevoer (3.4.2). Die massaspektrum van 3-metielappelsuur in die urien van die propioonasidemiepatiënte, word in Figuur 4.6 getoon.

In isovaleriaanasidemie, waar hoë konsentrasies 3-metielappelsuur verwag was, was selfs nie 'n spoor van die verbinding teenwoordig nie. Daarenteen was opspoorbare hoeveelhede 3-metielappelsuur by die propioonasidemiepatiënte teenwoordig, terwyl die voorkoms van die verbinding nie by hierdie pasiënte verwag is nie.



Figuur 4.5 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van chemies bereide 3-metielappelsuur.



Figuur 4.6 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van 3-metielappelsuur in die urien van 'n propioonasidemiepasiënt.

4.6 BEPALING VAN DIE PRODUK VAN FUMARASE MET MESAKONSUUR AS 'N SUBSTRAAT

4.6.1 Motivering

Volgens die resultate wat in 4.4.3 verkry is, wil dit voorkom of sitramaliensuur nie deur fumarase met mesakonsuur as 'n substraat gevorm word nie. Aangesien 3-metielappelsuur in die propioonasidemiepatiënte se urien teenwoordig was, bestaan die moontlikheid dat 3-metielappelsuur in plaas van sitramaliensuur, deur hierdie reaksie gevorm word. Hill en Bradshaw (1969:99) beweer dat mesakonsuur as 'n kompeterende inhibeerder van fumarase optree wat ook daarop dui dat mesakonsuur wel aan die ensiem kan bind. Om eersgenoemde stelling te bewys was dit nodig om 'n *in vitro*-reaksie met fumarase en mesakonsuur uit te voer en aan te toon dat 3-metielappelsuur as produk gevorm word. Fumarase en mesakonsuur is kommersieël beskikbaar en is vir die ondersoek aangewend.

4.6.2 Resultate

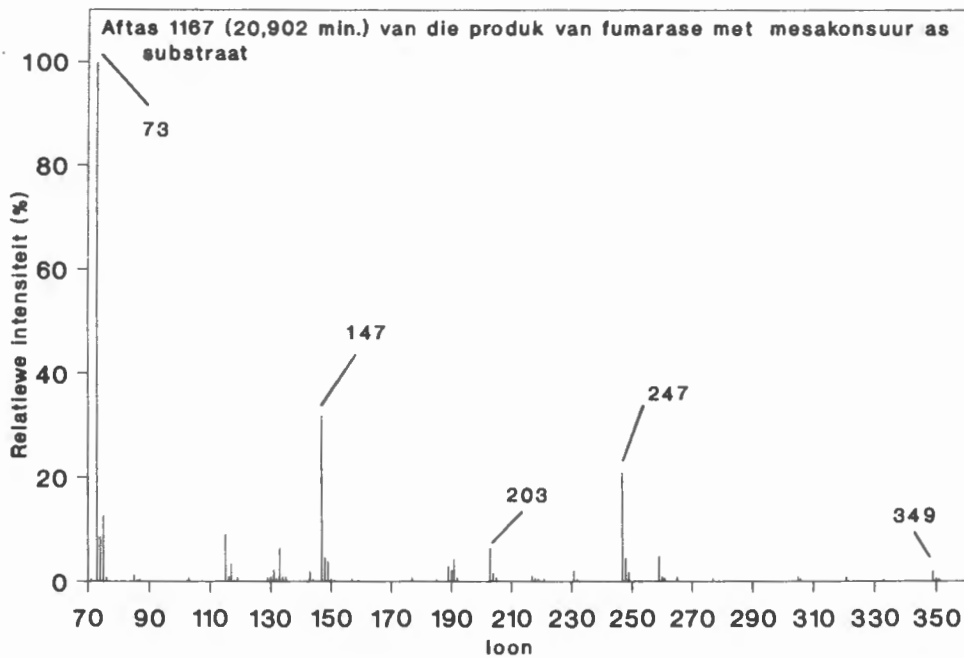
Die ensiemreaksie is soos wat in 3.6.1 beskryf is uitgevoer en die reaksiemengsel is aan verdere prosedures soos in 3.3.1 en 3.3.2.1 beskryf is onderwerp waarna 'n GC-MS-analise op die TMS-derivate uitgevoer is (3.4.2).

'n Verbinding met 'n byna identiese massaspektrum aan dié van sitramaliensuur maar wat later tydens die GC-MS-analise geëlueer het (20.902 minute teenoor 20.104 minute in die geval van sitramaliensuur) is deur middel van die analise gevind (Figuur 4.7).

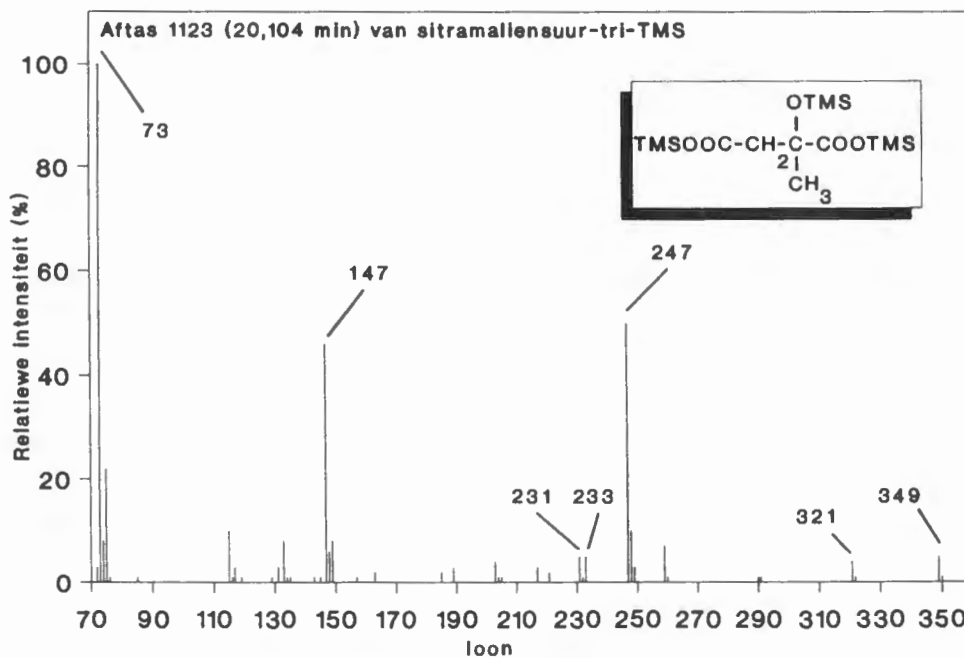
Hierdie verbinding was afwesig in die kontrole, waar mesakonsuur sonder ensiem geïnkubeer is. 'n Hoë konsentrasie appelsuur het in die tweede kontrole-eksperiment (fumarase met fumaarsuur as substraat) voorgekom.

Die massaspektrum en elueringstyd van die produk van die fumarasereaksie was identies aan dié van die chemies bereide 3-metielappelsuur (Figuur 4.5) sowel as 3-metielappelsuur wat in die urien van die propioonasidemiepatiënte teenwoordig was (Figuur 4.6).

Dit blyk dus dat 3-metielappelsuur deur die reaksie van varkhartfumarase met mesakonsuur as 'n substraat gevorm word. Daar kan egter nie aanvaar word dat die mensfumarase dieselfde produk sal vorm nie. Dit was ook opvallend dat 3-metielappelsuur nie in die urien van die isovaleriaanasidemiepatiënte voorgekom het nie.



Figuur 4.7 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van die produk van fumarase met mesakonsuur as 'n substraat.



Figuur 4.8 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van sitramallensuur.

4.6.3 Bespreking

Dit blyk dat 3-metielappelsuur as produk van die fumarasereaksie met mesakonsuur as 'n substraat gevorm word. Dit is egter nie bekend of 3-metielappelsuur wel by die mens deur hierdie reaksie sal ontstaan nie aangesien varkhardt fumarase in die ondersoek gebruik is.

By die isovaleriaanasidemie pasiënte, waar hoë konsentrasies 3-metielappelsuur verwag was, het selfs nie 'n spoor van die verbinding voorgekom nie. In teenstelling hiermee was opspoorbare konsentrasies 3-metielappelsuur by die propioonasidemie pasiënte teenwoordig, 'n verskynsel wat ook nie verwag is nie. Dit sou egter moontlik kon wees dat 3-metielappelsuur uit 'n ander weg by hierdie pasiënte afkomstig is, byvoorbeeld via 3-metieloksaalasynsuur in die omgekeerde reaksie van die Krebs siklus.

Die afwesigheid van 3-metielappelsuur in die urien van die isovaleriaanasidemie pasiënte kan moontlik aan die volgende toegeskryf word: 3-Metielappelsuur mag soos waargeneem is, stadig uit mesakonsuur gevorm word maar dan moontlik vinnig na 3-metieloksaalasynsuur afgebreek word. Soos later aangetoon sal word, is hierdie verbinding geweldig onstabiel en word vinnig spontaan na 2-ketobottersuur gedekarboksileer. 3-Metielappelsuur sal gevolglik nie in die urien uitgeskei word nie. Die moontlikheid dat 3-metieloksaalasynsuur wel gevorm word is in die opvolgende eksperimente ondersoek.

2-Ketobottersuur word deur 2-ketobottersuurdehidrogenase na propioniel-KoA omvorm en via propioniel-KoA-karboksilase na suksiniel-KoA. Die voorgestelde kataboliese weg vir metielsuksiensuur sou dus uiteindelik via 2-ketobottersuur deur 'n normale metaboliese weg kon verloop, wat impliseer dat metielsuksiensuur volledig afgebreek kan word. Omdat propioniel-KoA-karboksilase defektief is in propioonasidemie, sal 2-ketobottersuur nie tot die verdere katabolisme van metielsuksiensuur by hierdie pasiënte lei nie. Dit mag die rede wees waarom 3-metielappelsuur deur propioonasidemie-pasiënte uitgeskei word.

4.7 'N ONDERSOEK NA DIE KATABOLISME VAN 3-METIELAPPELSUUR

4.7.1 Benaderingswyse

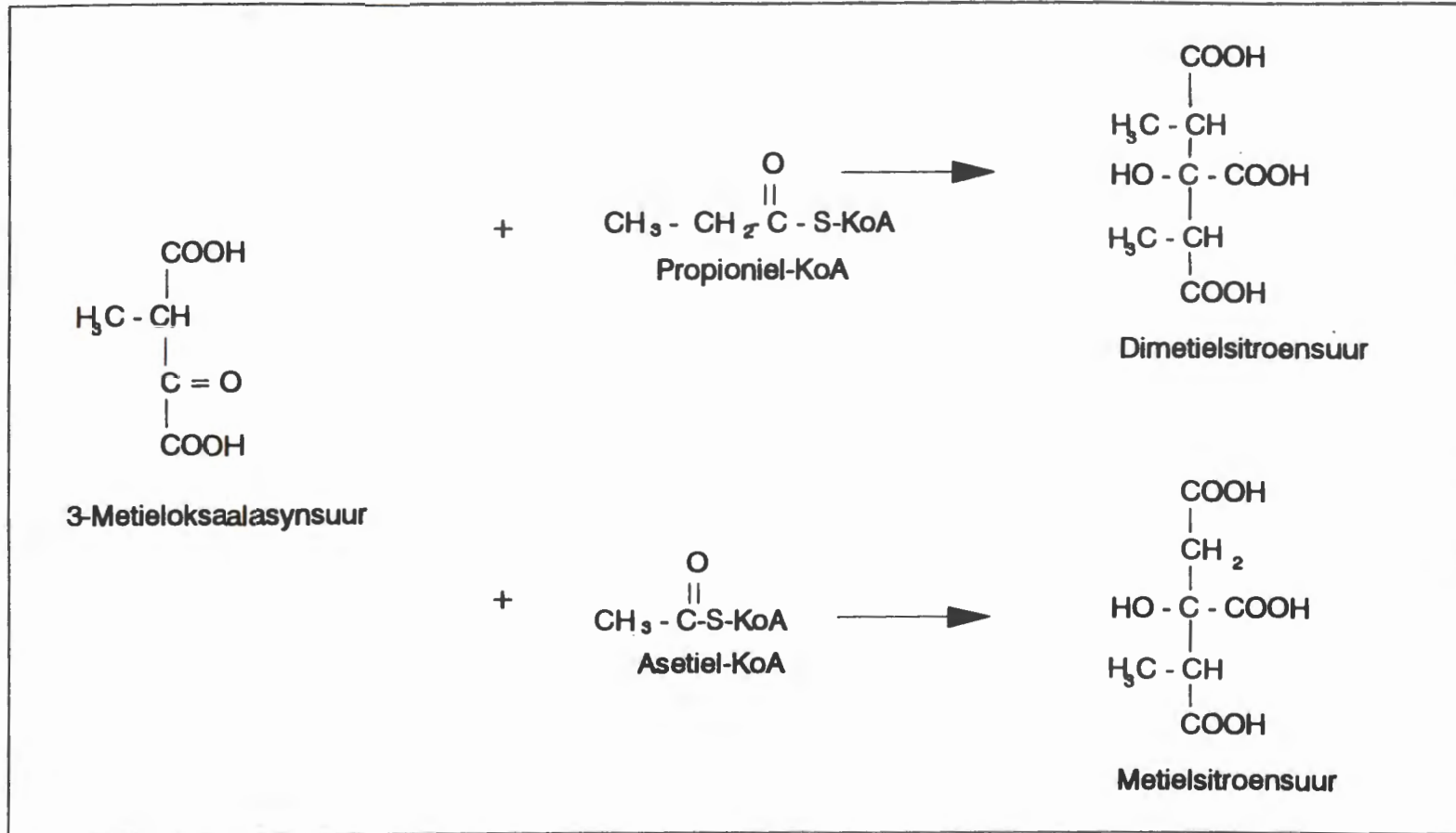
3-Metielappelsuur sou moontlik deur malaatdehidrogenase na 3-metieloksaalasynsuur gekataboliseer kon word. Die ideaal sou wees om 3-metielappelsuur met malaatdehidrogenase te inkubeer om die afbraak van 3-metielappelsuur te ondersoek. Chemies bereide 3-metielappelsuur kom egter in vier isomere voor, waarvan sommige moontlike inhibeerders mag wees. Inkubasie met hierdie verbinding sou dus tot inhibisie van die reaksie lei en geen produk sou gevind word nie.

Daar is geen aanduidings uit die literatuur dat 3-metieloksaalasynsuur deur pasiënte met isovaleriaanasidemie, propioonasidemie of etielmaloniel-adipiensuururie gevorm word of dat dit in hul urien teenwoordig is nie. Hierdie verbinding dekarboksileer egter spontaan na 2-ketobottersuur en sal dus nie in die urien of enige ander liggaamsvloeistof van die pasiënte opgespoor kan word nie. Daar moes dus 'n totaal ander benadering gevolg word om aan te toon dat 3-metieloksaalasynsuur wel gevorm word.

Die aangebore defek in propioniel-KoA-karboksilase maak 'n unieke indirekte benadering om die bestaan van 3-metieloksaalasynsuur in propioonasidemie aan te toon moontlik. Eerstens, aangesien hierdie ensiem nie aktief is nie, sal 3-metieloksaalasynsuur nie soos voorheen vermeld is via 2-ketobottersuur na suksiniel-KoA omvorm kan word nie. Met 'n aktiewe propioniel-KoA-karboksilase sou daar geen aanduidings wees dat 3-metielappelsuur na 3-metieloksaalasynsuur omvorm kan word nie, tensy stabiele-isotoopmerking gebruik word. Tweedens, omdat dit bekend is dat propioniel-KoA as substituuat vir asetiel-KoA in die meeste ensiemreaksies kan optree, sou 3-metieloksaalasynsuur moontlik deur 'n kondensasiereaksie met propioniel-KoA deur sitraatsintetase, aan dimetielsitroensuur oorsprong kon gee (Figuur 4.9). Die teenwoordigheid van laasgenoemde verbinding in die urien van propioonasidemiepasiënte is dus gebruik om die bestaan van 3-metieloksaalasynsuur aan te dui.

Dit sou ook moontlik kon wees dat asetiel-KoA met 3-metieloksaalasynsuur deur sitraatsintetase kondenseer sodat metielsitroensuur as 'n produk gevorm word. 'n

Tweede benadering om aan te toon dat 3-metieloksaalasynsuur gevorm word was dus om te bewys dat metielsitroensuur in die urien van die isovaleriaanasidemiepatiënte teenwoordig is asook dat metielsitroensuur in 'n *in vitro*-ensiemsintese uit 3-metieloksaalasynsuur en asetiel-KoA gevorm word.



Figuur 4.9 'n Voorstelling van moontlike kondensasiereaksies, gekataliseer deur sitraatsintetase met 3-metieloksaalasynsuur as een van die substrate.

4.7.2 Resultate

4.7.2.1 Die teenwoordigheid van 3-metieloksaalasynsuur in propioonasidemie

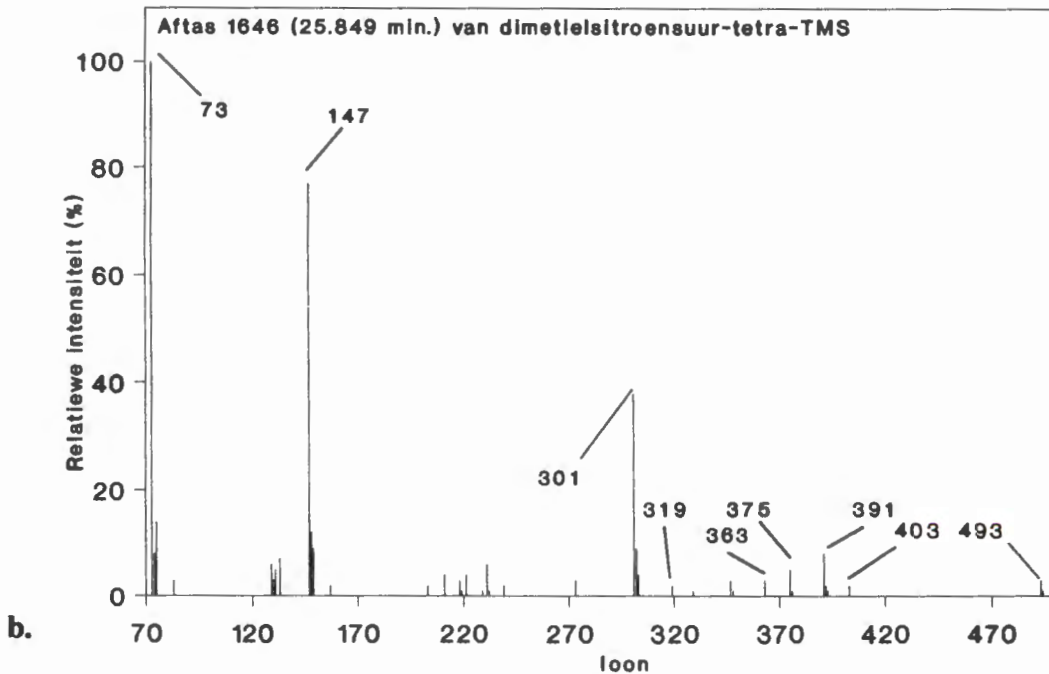
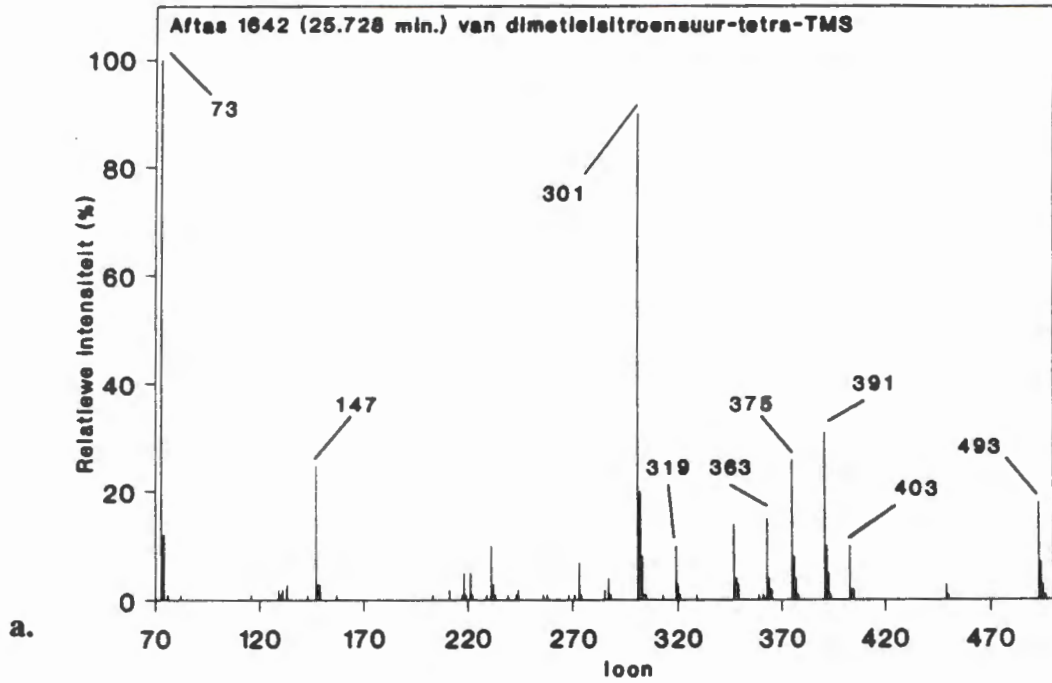
1,3-Dimetielsitroensuur is volgens die metode wat in 3.5.3 beskryf is gesintetiseer en na die vorming van TMS-derivate (3.3.2.1) aan 'n GC-MS-analise onderwerp (3.4.2). Drie enantiomeerpare is deur middel van die analise verkry, wat onderskeidelik op die retensietye 25.782, 25.849 en 29.950 minute geëlueer het. Die molekulêre massa van die verbindings was 508 massa-eenhede soos deur die $[493]^+$ (M-15)-ioonfragment aangedui word. Die verbinding toon ook 'n prominente $[301]^+$ -ioonfragment en $[319]^+$ -, $[363]^+$ -, $[375]^+$ -, $[391]^+$ -, en $[403]^+$ -ioonfragmente in laer intensiteite. Die massaspektra van die drie enantiomeerpare word in Figuur 4.10 a, b en c getoon. Die verskillende isomere van hierdie verbindings is waarskynlik dié wat in Figuur 4.11 vermeld word. Hoewel 1,3-dimetielsitroensuur slegs twee chirale sentra het, bestaan ses moontlike isomere, soos ook blyk uit die drie pieke wat deur die analise verkry is.

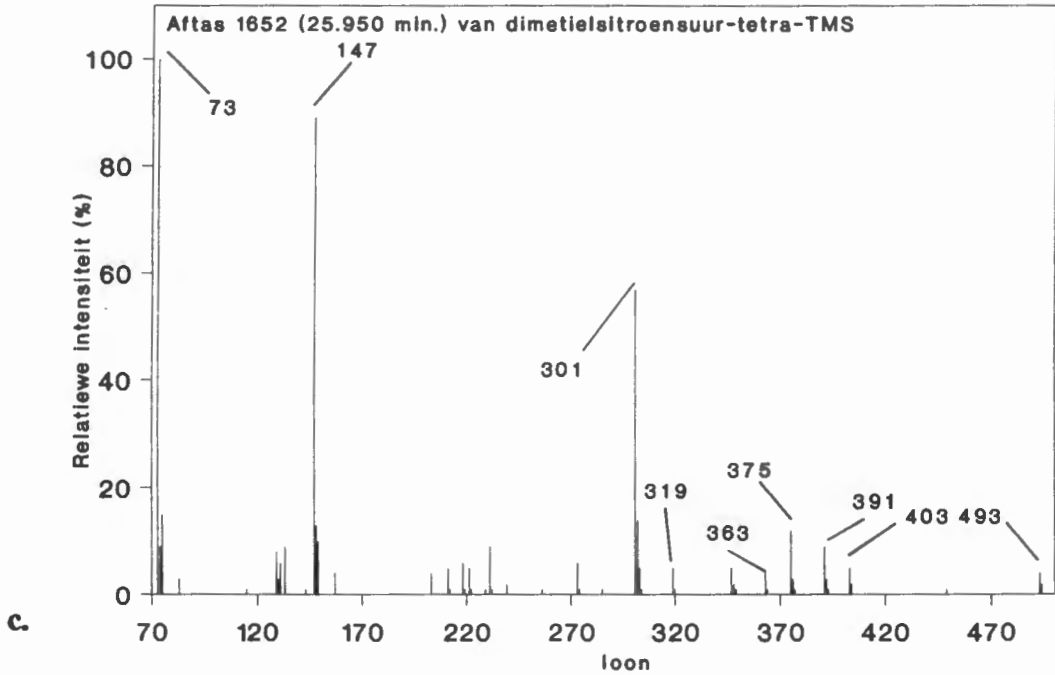
Die fragmentasiepatroon van die ioonfragmente het 'n duidelike verwantskap met dié van metielsitroensuur getoon. Die verkrygte massaspektra van die chemies bereide 1,3-dimetielsitroensuur-tetra-TMS is as standaard gebruik om die urienmonsters van die propioonasidemie pasiënte vir die teenwoordigheid van hierdie verbinding te ondersoek.

Urienmonsters van die propioonasidemie pasiënte is aan organiese suurekstraksies (3.3.1), vorming van TMS-derivate (3.3.2.1) en GC-MS-analises (3.4.2) onderwerp. Die urinêre 1,3-dimetielsitroensuur is soos in 3.4.3 beskryf is gekwantifiseer.

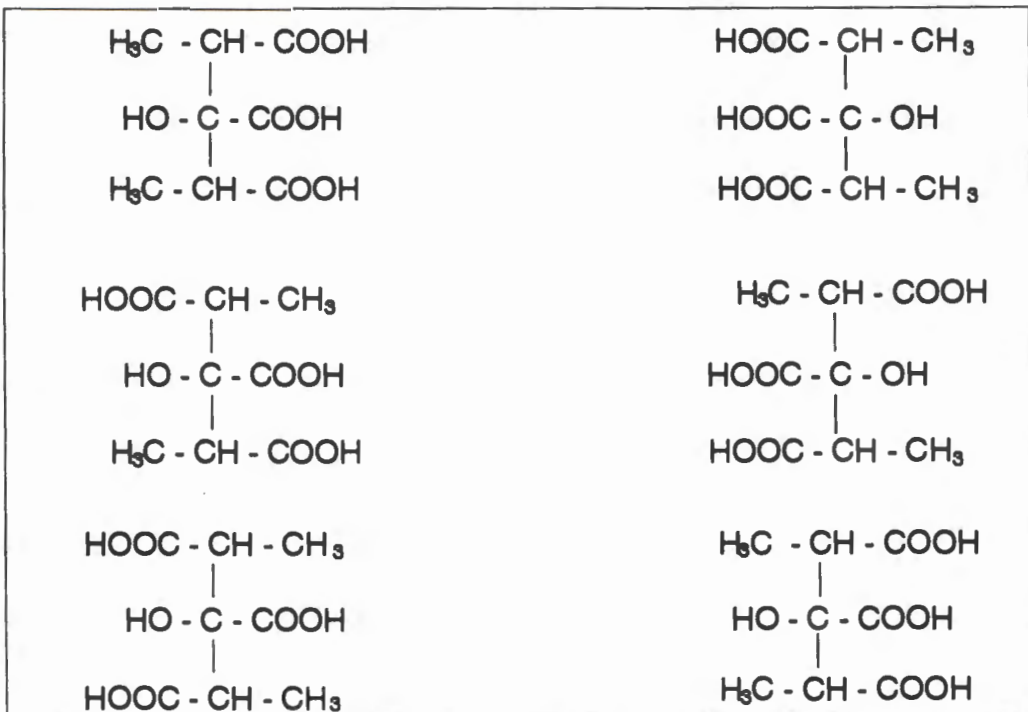
Een enantiomeerpaar het in die urien van die meeste pasiënte in maklik opspoorbare konsentrasies voorgekom. Die massaspektrum van hierdie verbinding in die urien van die propioonasidemie pasiënte word in Figuur 4.12 getoon. Die konsentrasies van die urinêre 1,3-dimetielsitroensuur word in Tabel 4.3 getoon.

Die teenwoordigheid van 1,3-dimetielsitroensuur in die urien van hierdie pasiënte het bevestig dat 3-metieloksaalasynsuur wel in propioonasidemie gevorm word. Soos reeds vermeld is, ontstaan 1,3-dimetielsitroensuur moontlik deur 'n kondensasie van propioniel-KoA met 3-metieloksaalasynsuur deur sitraatsintetase.

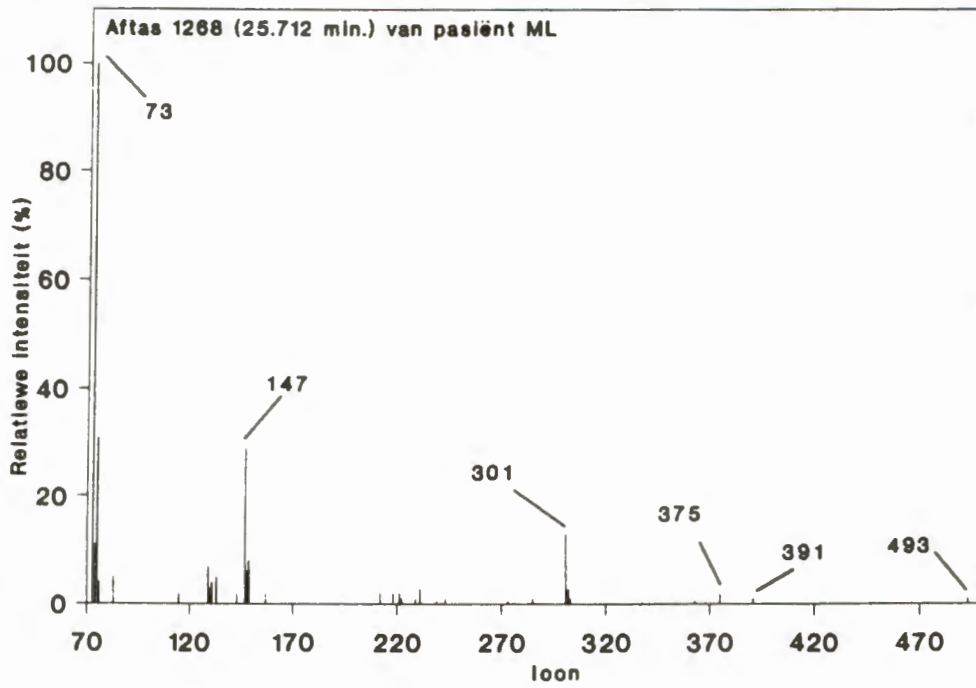




Figuur 4.10 a, b en c. Elektronionisasie-massaspektra van die chemies bereide enantiomeerpere van 1,3-dimetielsitroensuur-tetra-TMS



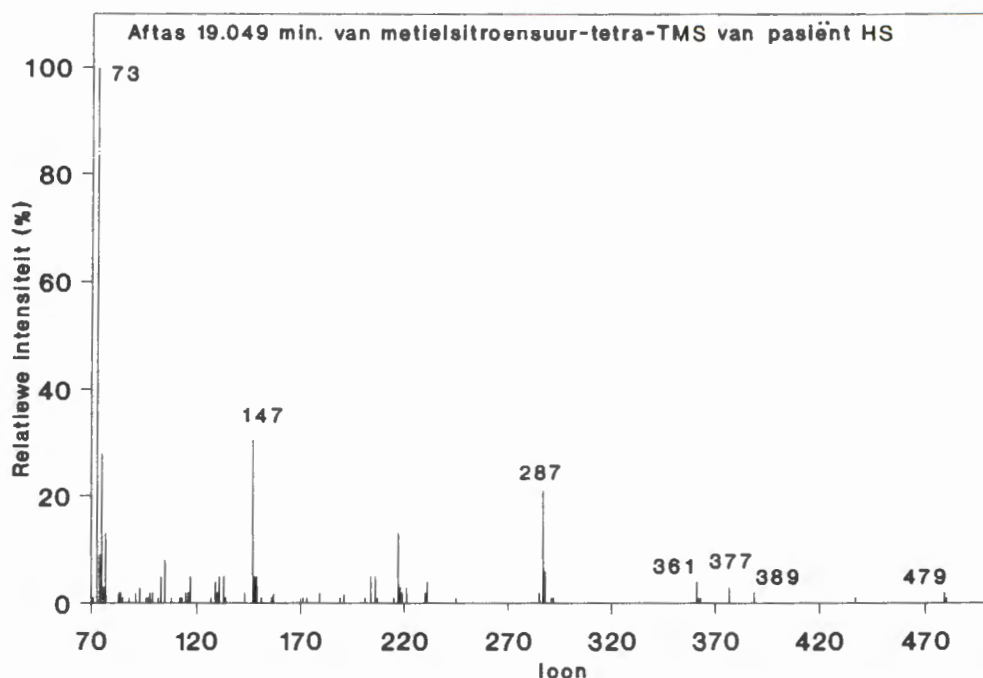
Figuur 4.11 Moontlike diastereo-isomere van 1,3-dimetielsitroensuur.



Figuur 4.12 Elektronisasie-massaspektrum van die TMS-esters van 1,3-dimetielsitroensuur in die urien van propioonasidemiepatiënte.

Tabel 4.3 Konsentrasies (mmol/mol kreatinien) van 1,3-dimetielsitroensuur in die urien van propioonasidemiepatiënte.

Pasiënt	1,3-Dimetielsitroensuur
BB	0.5
ML	0.61
EK	Afwesig
JP	Afwesig
KM	Spoor
ML2	0.8
Kontrole	Afwesig



Figuur 4.14 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van metielsitroensuur, in die urien van 'n isovaleriaanasidemiepatiënt.

4.7.2.3 3-Metieloksaalasynsuur as 'n substraat vir sitraat-(*si*)-sintetase

3-Metieloksaalasynsuur is chemies berei soos in 3.5.2 beskryf is en TMS-derivate is gevorm (3.3.2.1). 'n GC-MS-analise (3.4.2) van die verbinding het twee pieke getoon, wat onderskeidelik op retensietye 21.132 en 21.423 minute geëlueer het. Die twee pieke verteenwoordig moontlik die keto- en enolvorme van 3-metieloksaalasynsuur. Die massaspektrum van die TMS-derivaat van die chemies bereide 3-metieloksaalasynsuur word in Figuur 4.15 getoon. 3-Metieloksaalasynsuur-tri-TMS het 'n molekulêre massa van 362 massa-eenhede met 'n M-15-ioonfragment van $[347]^+$ wat duidelik op die massaspektrum waarneembaar is. Die fragmentasiepatroon toon ook 'n duidelike verwantskap met dié van oksaalasynsuur.

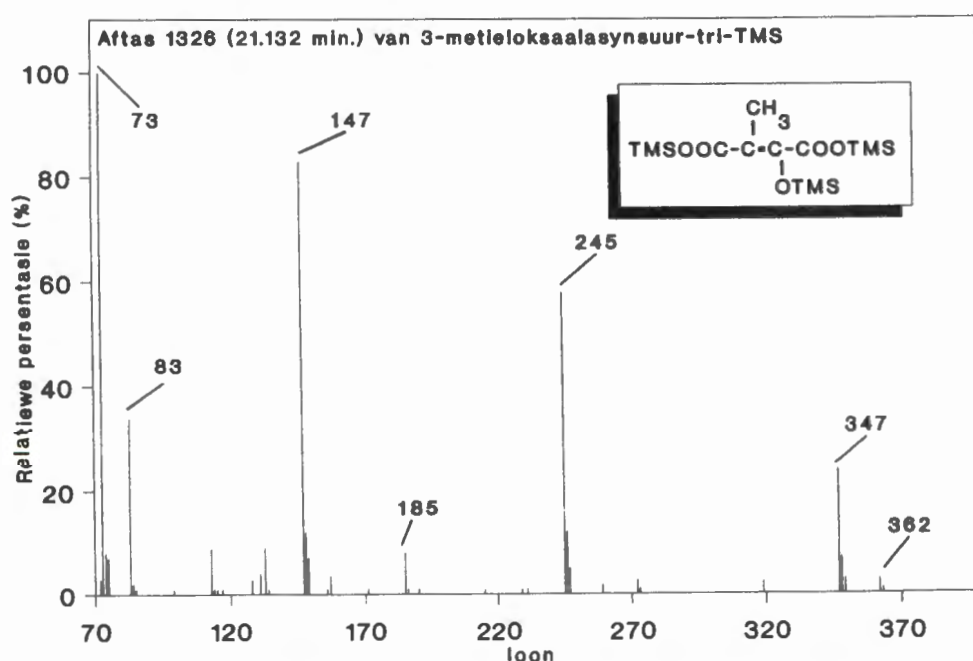
Die ensiemreaksie met 3-metieloksaalasynsuur, asetiel-KoA en sitraatsintetase is uitgevoer soos in 3.6.2 beskryf is. Die reaksiemengsel is na inkubasie aan 'n organiese suurekstraksie (3.3.1), derivatisering (3.3.2.1) en GC-MS-analise (3.4.2) onderwerp. Lae konsentrasies metielsitroensuur en hoë konsentrasies 2-ketobottersuur is deur middel van

die analise in die reaksiemengsel aangetoon. Metielsitroensuur het as twee enantiomeerpere voorgekom wat onderskeidelik op retensietye 24.541 en 24.625 minute geëlueer het. Die massapektra van hierdie verbindings was dieselfde as dié van (2S,3S)- en (2S,3R)-metielsitroensuur hoewel dit moontlik is dat dit die (2R,3R)- en (2R,3S)-isomere kan wees. Die twee enantiomeerpere wat in hierdie reaksie gevorm is, was in gelyke konsentrasies teenwoordig. Dit is in teenstelling met die enantiomeerpere wat in die reaksie van propioniel-KoA met oksaalasynsuur gevorm word (Mienie, 1994:260).

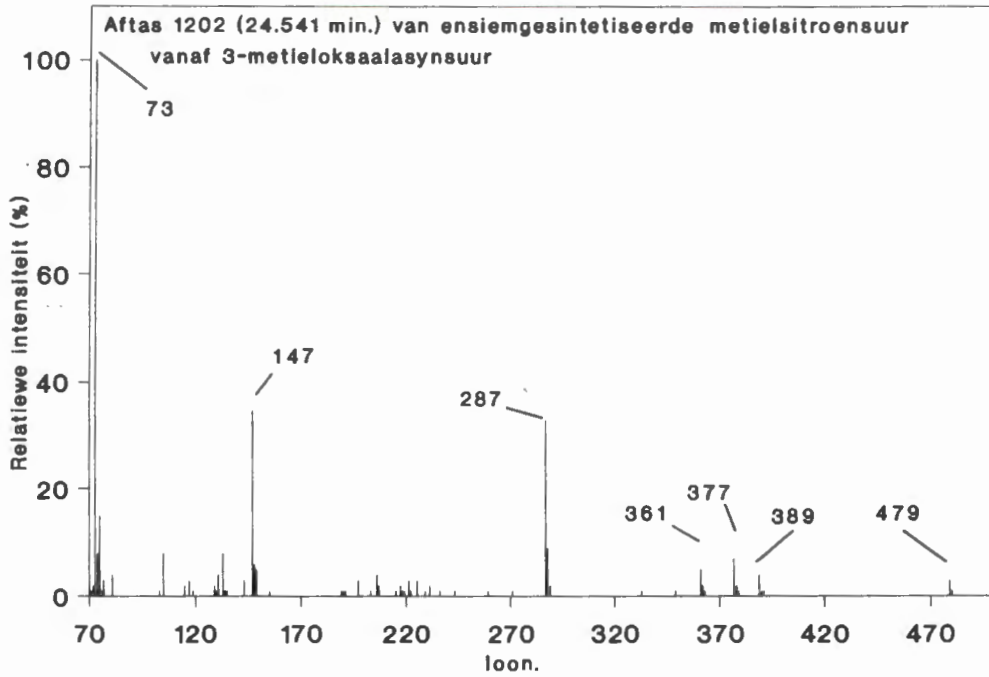
Die resultate van hierdie eksperiment het dus aangetoon dat 3-metieloksaalasynsuur as 'n substraat vir sitraatsintetase kan optree en deur kondensasie met asetiel-KoA aan metielsitroensuur oorsprong gee. Sodoende word 'n alternatiewe weg vir die vorming van metielsitroensuur daargestel.

Die hoë konsentrasies 2-ketobottersuur wat in die reaksiemengsel teenwoordig was dui op spontane dekarboksilering van 3-metieloksaalasynsuur en kan ook die teenwoordigheid van die lae konsentrasies metielsitroensuur verklaar.

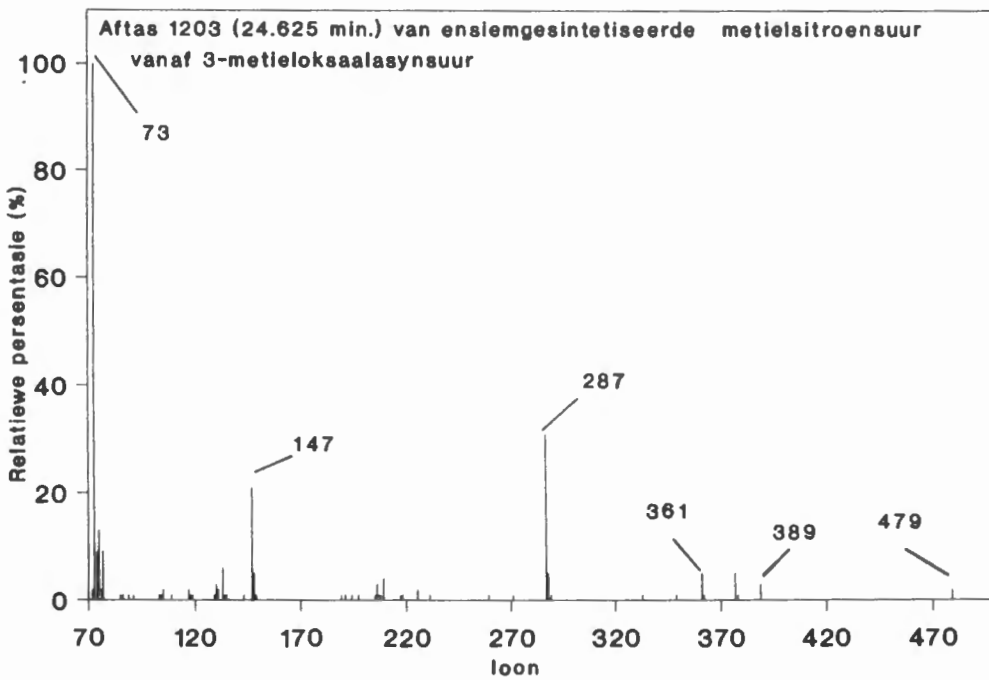
Die twee isomere van metielsitroensuur kan aan twee isomere van 3-metieloksaalasynsuur toegeskryf word. Beide isomere van laasgenoemde verbinding tree dus as 'n substraat vir sitraatsintetase op.



Figuur 4.15 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van chemies bereide 3-metieloksaalasynsuur.



a.



b.

Figuur 4.16 a en b Elektronisasie-massaspektra van die TMS-derivaat van die isomere van metielsitroensuur, soos deur sitraatsintetase met 3-metieloksaalasyneur as 'n substraat gevorm.

4.7.2.4 Die katabolisme van 3-metieloksaalasynsuur via 2-ketobottersuur

3-Metieloksaalasynsuur kan moontlik deur pirovaatkarboksilase na 2-ketobottersuur afgebreek word. Scrutton *et al.* (1969:245) het die karboksilering van 2-ketobottersuur deur pirovaatkarboksilase om 3-metieloksaalasynsuur te vorm, in hoenderlewer beskryf. Die reaksie vind teen ongeveer 3% van die tempo van die karboksilering van pirovaat plaas. Omdat hierdie ensiem normaalweg ook die dekarboksileringsreaksie kataliseer, sou dit moontlik kon wees dat 3-metieloksaalasynsuur deur pirovaatkarboksilase na 2-ketobottersuur omvorm word.

2-Ketobottersuur word normaalweg deur 2-ketobottersuurdehidrogenase na propioniel-KoA omvorm, wat deur propioniel-KoA-karboksilase aan suksiniel-KoA oorsprong gee. Weens die defek in propioniel-KoA-karboksilase sal metielsuksiensuur nie in propioonasidemie deur hierdie weg verder as 2-ketobottersuur afgebreek kan word nie. In hierdie pasiënte kan die omgekeerde weg wel funksioneer en dit is trouens een van die voorgestelde weë vir die vorming van metielsuksiensuur in hierdie studie in propioonasidemie. Deur hierdie weg sal dimetielsitroensuur weer deur kondensasie van propioniel-KoA met 3-metieloksaalasynsuur deur sitraatsintetase ontstaan.

In isovaleriaanasidemie is dit egter wel moontlik dat 3-metieloksaalasynsuur via 2-ketobottersuur deur die normale metabolisme na suksiniel-KoA omvorm kan word. Op hierdie wyse kan metielsuksiensuur dus volledig afgebreek word deur uiteindelik 'n metaboliet te vorm wat deel van die normale intermediêre metabolisme is.

Hoewel die voorgestelde reaksie teen slegs 3% van die tempo van die normale reaksie verloop, dekarboksileer 3-metieloksaalasynsuur ook spontaan na 2-ketobottersuur wat daarop dui dat die kataboliese produkte van metielsuksiensuur moontlik volledig via hierdie weg opgeruim kan word.

Die beskryfde pirovaatkarboksilase-gekataliseerde reaksie vind egter in hoenderlewer plaas (Scrutton *et al.*, 1969:235) en daar kan nie bloot aanvaar word dat pirovaatkarboksilase by die mens dieselfde produk sal vorm nie. Ensieme wat uit mensweefsel

geïsoleer is, is nie kommersieël verkrygbaar nie en hierdie aangeleentheid kon nie *in vitro* verder ondersoek word nie. Indien 2-ketobottersuur deur pirovaatkarboksilase na 3-metieloksaalasynsuur omvorm word sou laasgenoemde waarskynlik verder deur 'n kondensasie met asetiel-KoA deur sitraatsintetase, tot metielsitroensuur in isovaleriaanasidemie pasiënte lei. Die vorming van metielsitroensuur op hierdie wyse is egter reeds in 4.7.2.2 by hierdie pasiënte aangetoon. Hoewel dit moontlik sou kon wees dat 3-metielappelsuur en 2-ketobottersuur onderskeidelik nie tot dieselfde 3-metieloksaalasynsuur-isomere lei nie, sal beide isomere deur keto-enoltoutomerisasie daargestel word. Daar sou dus nie tussen die reaksies van malaatdehidrogenase en pirovaatkarboksilase onderskei kon word deur spesifieke isomere van metielsitroensuur aan 'n spesifieke reaksie toe te skryf nie. Hierdie aangeleentheid kon dus nie verder ondersoek word nie.

In die lig van die feit dat 3-metieloksaalasynsuur ook spontaan na 2-ketobottersuur dekarboksileer, is dit egter moontlik dat die kataboliese produkte van metielsuksiensuur volledig deur hierdie weg opgeruim kan word ongeag of pirovaatkarboksilase daartoe sou bydra.

4.7.3 Bespreking

Dit blyk uit 4.7.2 dat 3-metielappelsuur in propioniasidemie via 3-metieloksaalasynsuur na 1,3-dimetielsitroensuur afgebreek kan word. Hierdie produk ontstaan moontlik deur kondensasie van propioniel-KoA met 3-metieloksaalasynsuur deur sitraatsintetase.

In isovaleriaanasidemie word metielsitroensuur waarskynlik deur 'n kondensasie soortgelyk aan bogenoemde gevorm, met asetiel-KoA in plaas van propioniel-KoA as 'n substraat. Sodoende word 3-metielappelsuur by hierdie pasiënte via 3-metieloksaalasynsuur na metielsitroensuur gemetaboliseer.

Die verdere katabolisme van 1,3-dimetielsitroensuur en metielsitroensuur is nie in hierdie studie ondersoek nie aangesien dit deur ander navorsers bestudeer word.

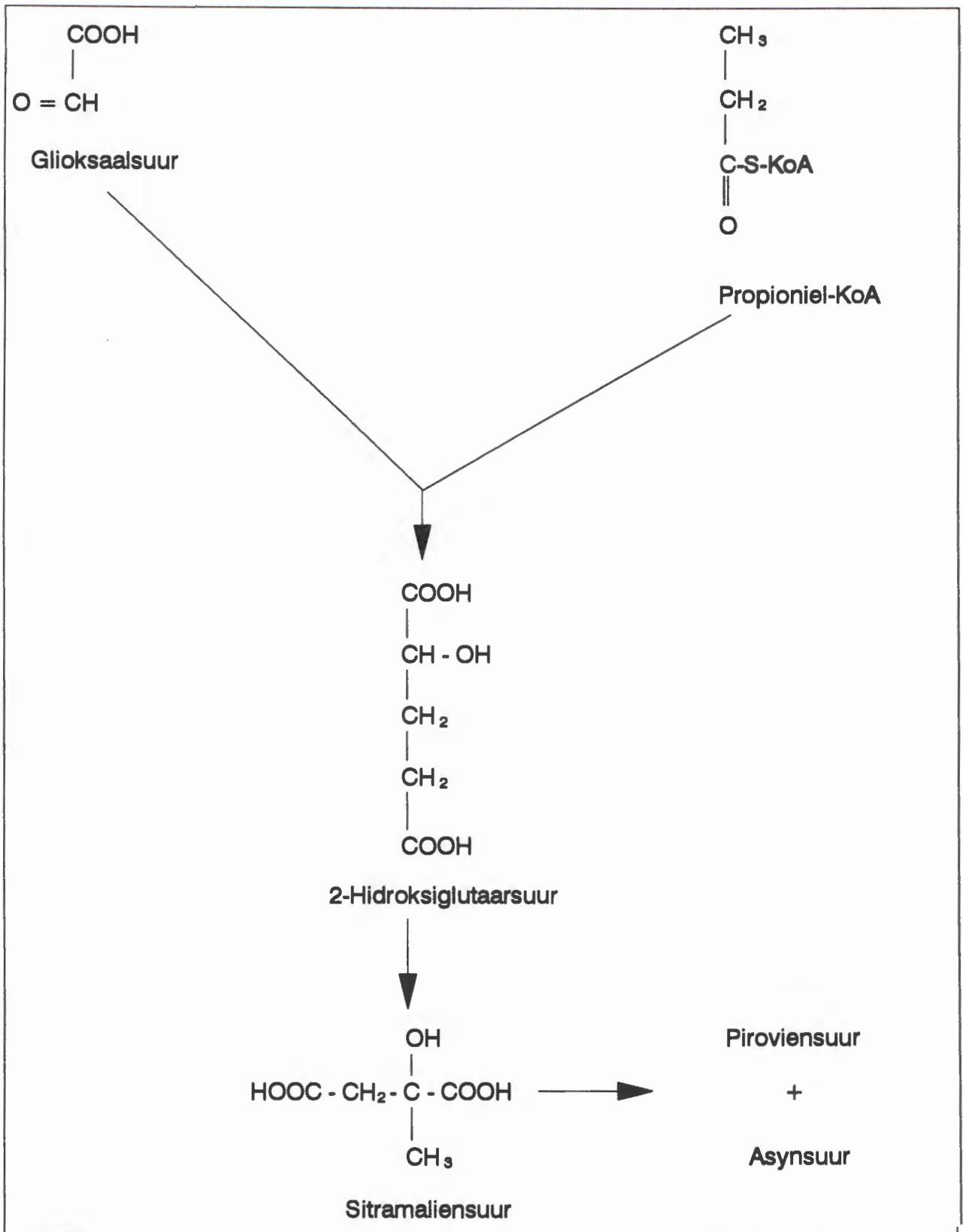
4.8 DIE OORSPRONG VAN SITRAMALIENSUUR (2-HIDROKSI-2-METIEL-SUKSIENSUUR IN PROPIOONASIDEMIE

4.8.1 Motivering

Soos in 4.1 vermeld is, was dit van groot belang om die oorsprong van sitramaliensuur vas te stel. Daar is verwag dat dit van metielsuksiensuur afkomstig is maar hierdie studie het aangetoon dat dit waarskynlik nie die geval is nie. Hoewel dit vir die doel van hierdie studie gevolglik nie verder nodig was om die oorsprong van sitramaliensuur te ondersoek nie, kon daar tog vanweë die strukturele ooreenkoms daarvan met 3-metielappelsuur, na die oorsprong van sitramaliensuur gekyk word. Hierdie verbinding kan weens die aard van sy struktuur nie afgebreek word nie en mag moontlik met die ernstige ketoasidose in propioonasidemie geassosieer word. Dit is daarom van groot belang dat die weg waaruit sitramaliensuur gevorm word gevind word aangesien dit sal bepaal watter terapeutiese maatreëls by hierdie pasiënte toegepas sal word om die moontlike effek van sitramaliensuur op te hef. As 'n uitbreiding van hierdie studie is daar na die oorsprong van sitramaliensuur ondersoek ingestel.

Greter *et al.* (1980:105) het vyftigvoudig verhoogde konsentrasies van sitramaliensuur in die urien van propioonasidemiepasiënte gevind en twee moontlikhede vir die oorsprong van die verbinding voorgestel. Die eerste, naamlik uit metielsitroensuur, is volgens die resultate van hierdie studie waarskynlik nie korrek nie. 'n Alternatiewe moontlikheid, naamlik 'n kondensasie van glioksaalsuur met propioniel-KoA om 2-hidroksiglutaarsuur te vorm en dan deur isomerisasie aan sitramaliensuur oorsprong te gee, is deur hierdie navorsers voorgestel. Hierdie weg word in Figuur 4.17 getoon. 'n Soortgelyke weg funksioneer in plante en mikroorganismes.

In die eerste gedeelte van die ondersoek na die oorsprong van sitramaliensuur is die alternatiewe weg van Greter *et al.* (1980:105), naamlik die kondensasie van glioksaalsuur met propioniel-KoA, dus ondersoek.



Figuur 4.17 Die voorgestelde vorming van sitramaliensuur deur 'n kondensasie van glioksaalsuur met propioniel-KoA via 2-hidroksiglutaarsuur.

4.8.2 'n Ondersoek na die vorming van sitramaliensuur via 2-hidroksiglutaarsuur deur kondensasie van propioniel-KoA met glioksaalsuur

4.8.2.1 Benaderingswyse

Greter en medewerkers (Greter *et al.*, 1980:105) het voorgestel dat hierdie weg in propioonasidemie pasiënte funksioneer. Indien hierdie hipotese korrek is behoort hoë konsentrasies 2-hidroksiglutaarsuur in propioonasidemie teenwoordig te wees. Hierdie verbinding word dikwels in glutaarsuururie tipe II gevind (Yamaguchi *et al.*, 1991:439). 'n Verdere aanduiding dat die voorgestelde weg bestaan sou dus die teenwoordigheid van baie hoë konsentrasies sitramaliensuur by glutaarsuururie tipe II-pasiënte wees. Daar is van hierdie twee kriteria gebruik gemaak om vas te stel of die hipotese dat sitramaliensuur deur die kondensasie van propioniel-KoA met glioksaalsuur via 2-hidroksiglutaarsuur gevorm word, geldig is.

4.8.2.2 Resultate

Urienmonsters van die pasiënte met propioonasidemie en glutaarsuururie tipe II is op dieselfde wyse as in al die vorige ondersoeke voorberei en aan GC-MS-analises onderwerp. Die urinêre 2-hidroksiglutaarsuur en sitramaliensuur is gekwantifiseer soos in 3.4.4 beskryf is. Die konsentrasies van hierdie metaboliete word in Tabel 4.4 getoon.

Hoë konsentrasies 2-hidroksiglutaarsuur het in propioonasidemie voorgekom maar daar was geen verband tussen die konsentrasies daarvan en dié van sitramaliensuur nie. Die sitramaliensuurkonsentrasies was in die geval van BB geweldig verhoog (206 mmol/mol kreatinien) in teenstelling met die ander pasiënte, waarby die hoogste konsentrasie van sitramaliensuur 9.3 mmol/mol kreatinien was. Pasiënt BB was geweldig ketoties tydens die versameling van die urienmonster (3-hidroksibottersuurkonsentrasies: > 1 000 mmol/mol kreatinien). Die 2-hidroksiglutaarsuurkonsentrasies in BB (22.7 mmol/mol kreatinien) was in vergelyking met die ander propioonasidemiepasiënte laer as in die meeste pasiënte (Tabel 4.4).

In glutaarsuururie tipe II was die 2-hidroksiglutaarsuurkonsentrasies baie verhoog, terwyl die konsentrasies van sitramaliensuur normaal was (Tabel 4.4).

Sitramaliensuur word dus volgens hierdie resultate oënskynlik nie via 2-hidroksiglutaarsuur deur die kondensasie van propioniel-KoA met glioksaalsuur gevorm nie.

Tabel 4.4 Konsentrasies (mmol/mol kreatinien) van 2-hidroksiglutaarsuur en sitramaliensuur in die urien van pasiënte met propioonasidemie en glutaarsuururie tipe II.

Pasiënt	Diagnose	2-hidroksiglutaarsuur	Sitramaliensuur
ML	Propioonasidemie	72.5	6.9
ML2	Propioonasidemie	25.5	Afwesig
RK	Propioonasidemie	20.1	2.8
JP	Propioonasidemie	6.5	1.68
KM	Propioonasidemie	31.8	9.3
BB	Propioonasidemie	22.7	206.28
MM	Glutaarsuururie tipe II	258.3	2.14
BW	Glutaarsuururie tipe II	973.5	2.32
BW2	Glutaarsuururie tipe II	263.8	1.8
BW3	Glutaarsuururie tipe II	892.5	Afwesig
Kontrole	Gesonde persone	Spoor - 35.8	Spoor

4.8.3 'n Onderzoek na die vorming van sitramaliensuur deur 'n kondensasiereaksie van laktiel-KoA en asetiel-KoA

4.8.3.1 Motivering

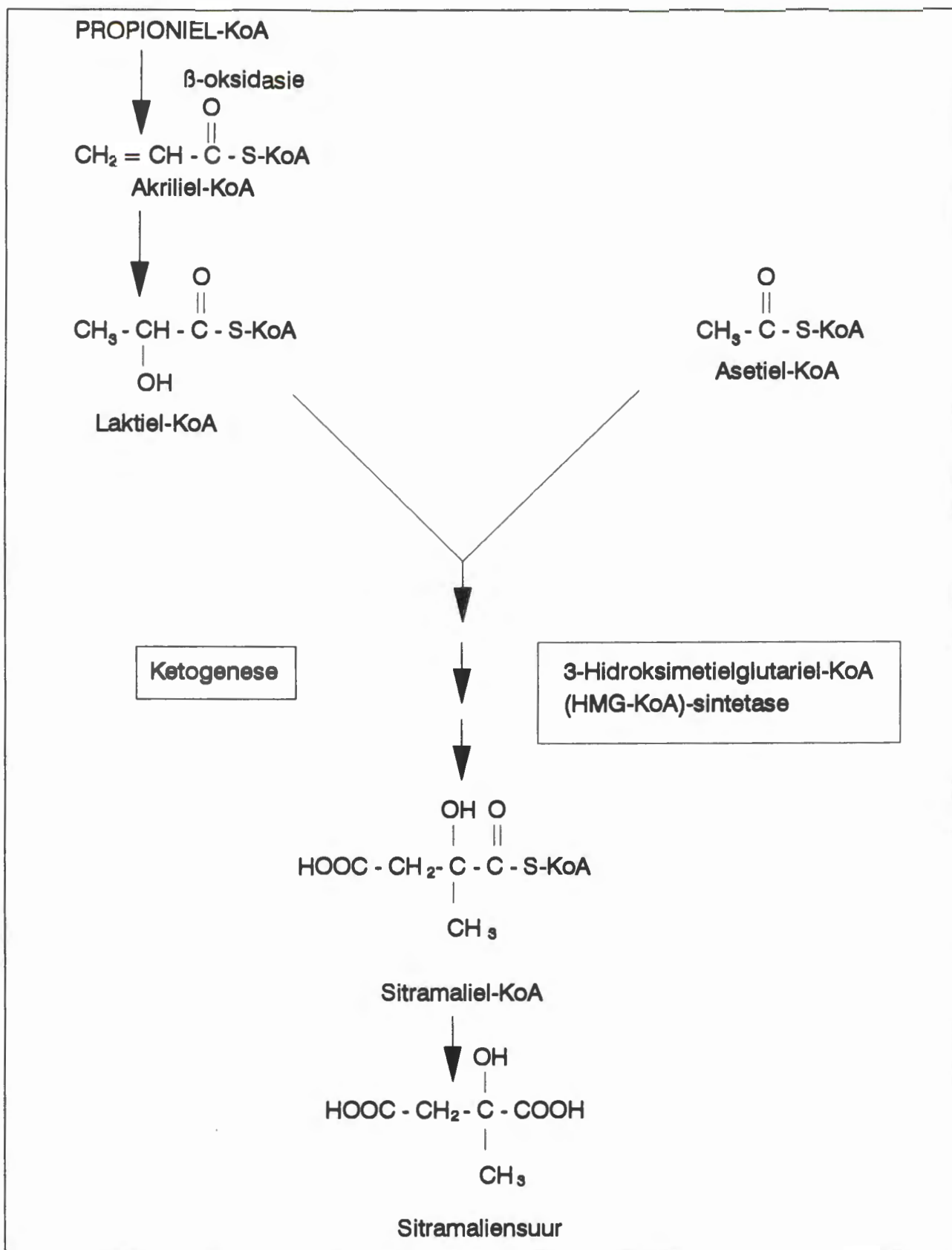
Die weg wat in 4.8.2 ondersoek is, is nie die enigste ander moontlikheid vir die vorming van sitramaliensuur nie. Behalwe vir die vorming van sitramaliensuur uit mesakonsuur wat volgens hierdie studie waarskynlik nie funksioneer nie, bestaan daar twee ander moontlikhede gebaseer op grond van weë wat in bakterieë voorkom.

- (i) *Clostridium tetanomorphum* kataliseer 'n omkeerbare reaksie tussen 3-metielappelsuur en mesakonsuur. Laasgenoemde word deur die organisme na sitramaliensuur omvorm, wat na piroviensuur en asynsuur of asetiel-KoA afgebreek word.

Propioonasidemiepatiënte sal waarskynlik nie deur 3-metielaspartiënsuur aan sitramaliensuur oorsprong gee nie hoewel daar in hierdie studie aangetoon is dat 3-metieloksaalasynsuur by hierdie pasiënte gevorm word. Laasgenoemde kan deur transaminasie van 3-metielaspartiënsuur gevorm word.

- (ii) Soos ook in (i) genoem is kataliseer sekere bakterieë die afbraak van sitramaliensuur na piroviensuur en asynsuur of asetiel-KoA. Hierdie weg is ook deur Lardy (1969:316) in soogdierlewer aangetoon. Losada *et al.* (1960:757) het aangetoon dat die omgekeerde weg, naamlik die vorming van sitramaliensuur uit piroviensuur en asetiel-KoA, deur 'n sitramalaat-sintetase in *Chromatium* kan plaasvind.

In die struktuur van sitramaliensuur, kan die onderskeie strukture van melksuur en asynsuur herken word. Daar word voorgestel dat sitramaliensuur deur 'n kondensasie van hierdie twee metaboliete mag ontstaan. Laktiel-KoA of piroviel-KoA mag met asetiel-KoA deur 3-hidroksi-3-metielglutariel-KoA-sintetase (HMG-KoA-sintetase) kondenseer en aan sitramaliensuur oorsprong gee. Hierdie voorgestelde weg word in Figuur 4.18 getoon en is vervolgens ondersoek.



Figuur 4.18 Die voorgestelde vorming van sitramaliensuur deur kondensasie van laktiel-KoA met asetiel-KoA.

4.8.3.2 Benaderingswyse

Die voorgestelde vorming van sitramaliensuur uit laktiel-KoA en asetiel-KoA kan moontlik deur 3-HMG-KoA-sintetase gekataliseer word. Hierdie ensiem is nie kommersieël verkrygbaar nie en die reaksie kon nie *in vitro* uitgevoer word nie. Die volgende alternatiewe benadering is gevolg:

Propioniel-KoA sou waarskynlik as 'n substituuat vir asetiel-KoA, as 'n substraat in die voorgestelde reaksie kon optree. In hierdie geval sou 2,3-dimetielappelsuur as produk kon vorm. As indirekte bewys dat die voorgestelde reaksie wel kan plaasvind is urienmonsters van die propioonasidemiepatiënte vir die teenwoordigheid van 2,3-dimetielappelsuur ondersoek.

4.8.3.3 Resultate

2,3-Dimetielappelsuur is chemies berei soos in 3.5.4 beskryf is. Die TMS-derivaat van die verbinding is aan 'n GC-MS-analise onderwerp (3.4.2) en die verkrygte massaspektrum is as standaard in die ondersoek gebruik. 2,3-Dimetielappelsuur het op 20.033 minute geëlueer en die massaspektrum toon duidelike ooreenkomste met dié van 3-metielappelsuur. Die massa van die TMS-derivaat van die verbinding is 378 massa-eenhede en word deur die $[363]^+$ (M-15)-ioonfragment aangedui. 'n Prominente $[261]^+$ -ioonfragment kom voor asook die $[163]^+$ -, $[233]^+$ - en $[335]^+$ -ioonfragmente in lae intensiteite. Hierdie massaspektrum word in Figuur 4.19 getoon.

Urienmonsters van die propioonasidemiepatiënte is soos in al die vorige ondersoeke vir GC-MS-analises voorberei en aan die analises onderwerp. Die urinêre 2,3-dimetielappelsuur is gekwantifiseer soos in 3.4.3 beskryf is. Die konsentrasies hiervan word in Tabel 4.5 getoon. Die massaspektrum van die verbinding in die urien van 'n propioonasidemiepatiënt word in Figuur 4.20 getoon.

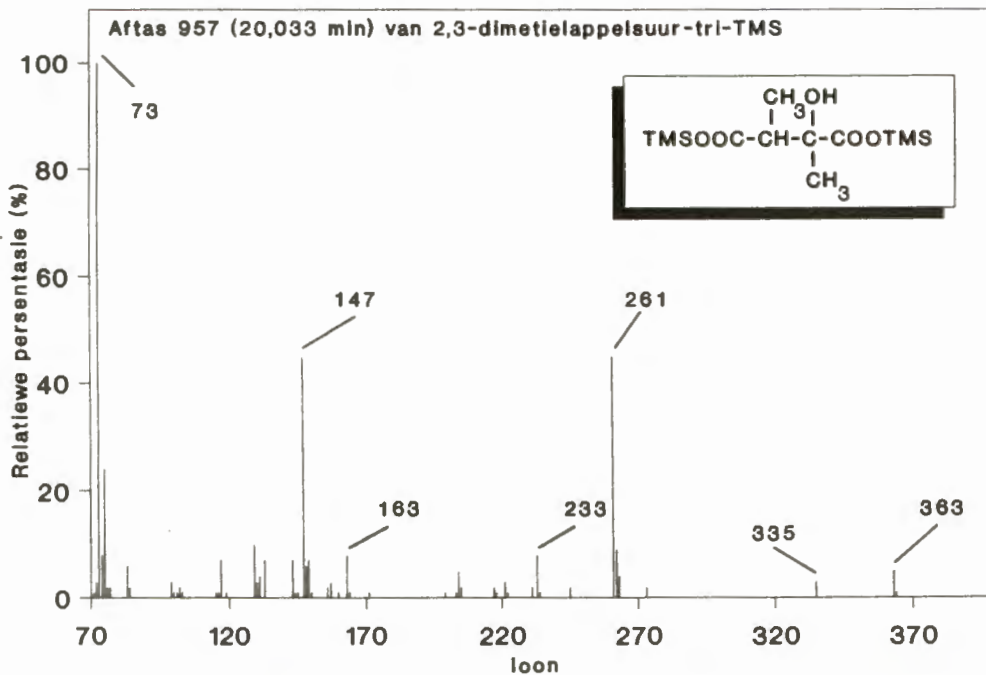
Verhoogde konsentrasies 2,3-dimetielappelsuur was in al die urienmonsters teenwoordig. Die konsentrasie daarvan in KM, wat nie ketoties was nie, was geweldig verhoog (54.5

mmol/mol kreatinien) (Tabel 4.5). BB, wat baie ketoties was (3-hidroksibottersuur-konsentrasie: > 1 000 mmol/mol kreatinien) het relatief lae konsentrasies van die verbinding uitgeskei (12.3 mmol/mol kreatinien) (Tabel 4.5) in vergelyking met sitramaliensuur wat veel hoër as in die ander pasiënte was (Tabel 4.4).

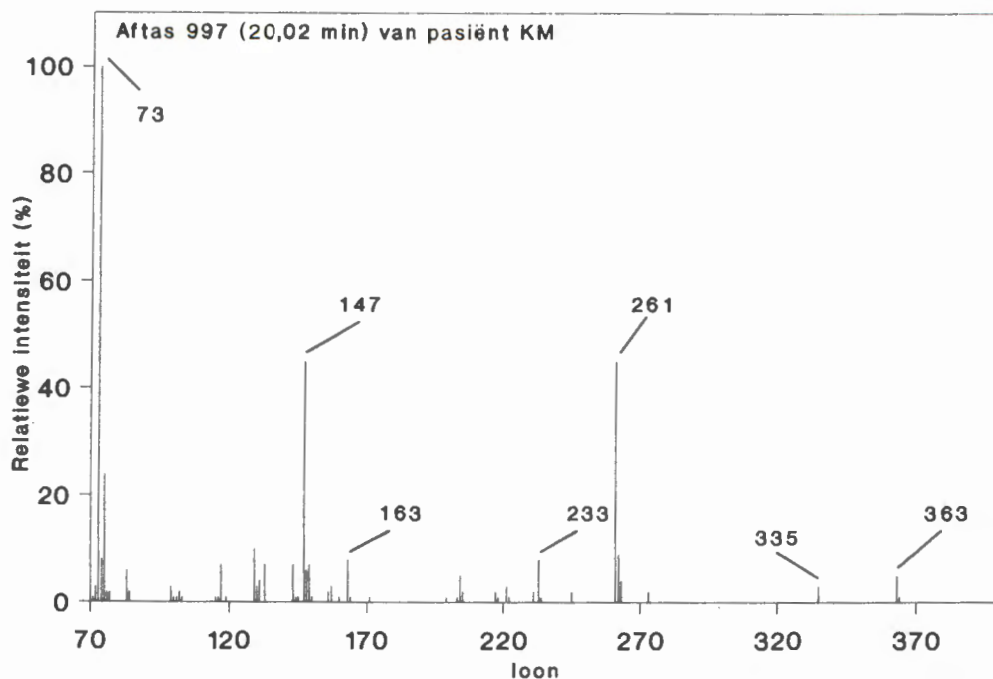
Tabel 4.5 Konsentrasies (mmol/mol kreatinien) van 2,3-dimetiellappelsuur in die urien van propioonasidemiepasiënte.

Pasiënt	2,3-Dimetiellappelsuur
ML1	17.66
EK	3.0
BB*	12.3
JP	4.6
KM	54.5
Kontrole	Afwesig

* Ketoties tydens die versameling van die urienmonster.



Figuur 4.19 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van chemies bereide 2,3-dimetiellappelsuur.



Figuur 4.20 Elektronionisasie-massaspektrum van die TMS-derivaat van 2,3-dimetiellappelsuur in die urien van 'n propioonasidemiepatiënt.

4.8.4 Bespreking

Dit wil voorkom of sitramaliensuur nie deur kondensasie van propioniel-KoA via 2-hidroksiglutaarsuur gevorm word nie. Soos in die vorige gedeeltes van die studie aangetoon is, word dit waarskynlik ook nie uit mesakonsuur gevorm nie en is dus nie 'n produk van die metielsuksiensuurkatabolisme nie.

Dit is oënskynlik moontlik dat 2,3-dimetiellappelsuur deur 'n kondensasie van propioniel-KoA met laktiel-KoA of piroviel-KoA gevorm kan word. 2,3-Dimetiellappelsuur was in maklik meetbare konsentrasies in die urienmonsters van al die propioonasidemiepatiënte teenwoordig. BB wat geweldig ketoties tydens die versameling van die urien was het 'n relatief lae konsentrasie 2,3-dimetiellappelsuur uitgeskei (12.3 mmol/mol kreatinien), terwyl die konsentrasie sitramaliensuur in hierdie pasiënt dramaties verhoog was (206 mmol/mol kreatinien) en ook aansienlik hoër as in die ander propioonasidemiepatiënte (hoogste konsentrasie 9.3 mmol/mol kreatinien). KM wat nie ketoties was nie het die hoogste konsentrasie 2,3-dimetiellappelsuur uitgeskei (54.5 mmol/mol kreatinien). Hierdie

waarneming sou moontlik aan 'n kompetisie tussen propioniel-KoA en asetiel-KoA vir die kondensasiereaksie toegeskryf kon word. Laktiel-KoA kan in propioonasidemie uit propioniel-KoA gevorm word (Rosenberg & Fenton, 1989:825) en is moontlik in propioonasidemie aktief (Kaziro & Ochoa, 1964:283). Dit is dus moontlik eerder laktiel-KoA as piroviel-KoA wat in die reaksie sal optree. Sitramaliensuur sou deur 'n soortgelyke kondensasie tussen laktiel-KoA en asetiel-KoA kon ontstaan. Die reaksie word moontlik deur 3-hidroksi-3-metielglutariel-KoA-sintetase gekataliseer. Hoewel die resultate in 4.8.3 aandui dat hierdie voorgestelde weg moontlik korrek is, is daar nog geen definitiewe bewyse vir hierdie aanname nie.

HOOFSTUK 5

SAMEVATTENDE BESPREKING, GEVOLGTREKKING EN SLOTBE- SKOUING

5.1 INLEIDING

Hierdie hoofstuk bied eerstens 'n samevatting van die belangrikste bevindings van die studie. Tweedens word 'n gevolgtrekking uit die resultate gemaak, wat met kliniese gevolge verband mag hou. As slotbeskouing volg enkele aanbevelings vir toekomstige studies.

5.2 DIE ISOMERE VAN METIELSUKSIENSUUR IN ISOVALERIAANASIDEMIE, PROPIOONASIDEMIE, GLUTAARSUURURIE TIPE II EN ETIELMALONIEL- ADIPIENSUURURIE

GC-MS-analises het beide die D- en die L-isomere van metielsuksienuur in isovaleriaanasidemie en propioonasidemie aangetoon. Lae konsentrasies van die twee isomere het in ekwimolêre konsentrasies in propioonasidemie voorgekom. In die pirovaatkarboksilasereaksie ontstaan beide isomere weens keto-enoltoutomerisasie. Hierdie resultate kon gevolglik nie uitsluitel gee oor watter isomere van metielsuksienuur deur karboksilering van 2-ketobottersuur gevorm word nie. Die konsentrasies van die twee isomere in isovaleriaanasidemiepatiënte was ekwimolêr in die sommige pasiënte, terwyl een van die isomere in laer konsentrasies in ander pasiënte voorgekom het. Afgesien van hierdie waarneming, het die resultate aangetoon dat die vorming van metielsuksienuur deur ω -oksidase van 4-hidroksi-isovaleriaansuur en dus ook 2-metielbottersuur, nie stereospesifiek plaasvind nie.

Die identiteit van die isomere van metielsuksienuur kon nie in glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie bepaal word nie. Meer as een van die genoemde weë kan in glutaarsuururie tipe II aan metielsuksienuur oorsprong gee, terwyl karboksilering

van butiriel-KoA waarskynlik hoofsaaklik vir die vorming van metielsuksiensuur in etielmaloniel-adipiensuururie verantwoordelik is (Mantagos *et al.*, 1979:1586). Beide isomere van metielsuksiensuur word by glutaarsuururie tipe II verwag aangesien ω -oksidase van 4-hidroksi-isovaleriaansuur en 2-metielbottersuur onderskeidelik in hierdie defek aan metielsuksiensuur oorsprong kan gee. Daar is reeds deur die resultate in isovaleriaanasidemie en propioonasidemie aangetoon dat hierdie twee verbindings nie deur stereospesifieke reaksies aan metielsuksiensuur-oorsprong gee nie.

Minstens die L-isomeer blyk by etielmaloniel-adipiensuururie teenwoordig te wees aangesien die konsentrasies van mesakonsuur ongeveer 50% van die konsentrasies van metielsuksiensuur was. Dit wil hiervolgens voorkom of minstens L-metielsuksiensuur deur karboksilering van butiriel-KoA gevorm word.

5.3 DIE KATABOLISME VAN METIELSUKSIENSUUR

Die kataboliese weg van L-metielsuksiensuur soos deur hierdie studie opgeklar is, word in Figuur 5.1 getoon. Daar is van 'n biochemies-analitiese benadering gebruik gemaak waar die identiteit van die geïnduseerde metaboliete op grond van die kennis van die meganismes van bestaande metaboliese weë voorspel is. Die weg is opgeklar deur bestudering van die produkte van *in vitro*-reaksies en die verbindings in die urien van pasiënte met isovaleriaanasidemie, propioonasidemie, glutaarsuururie tipe II, etielmaloniel-adipiensuururie en 2-metielasetoasetiel-KoA-tiolasedefek deur GC-MS-analises.

L-Metielsuksiensuur word eerstens deur suksinaatdehidrogenase na metielfumaarsuur (mesakonsuur) gedehidrogeneer. D-Metielsuksiensuur is 'n inhibeerder van hierdie ensiem en daar word aanvaar dat dit nie verdere katabolisme deur die bekende metaboliese reaksies ondergaan nie. Hierdie isomeer word dan moontlik uitgeskei.

Mesakonsuur word deur fumarase na 3-metielappelsuur omvorm. Laasgenoemde word na 3-metieloksaalasynsuur gekataboliseer. Malaatdehidrogenase kan waarskynlik hierdie reaksie kataliseer. 3-Metieloksaalasynsuur kan met asetiel-KoA kondenseer om

metielsitroensuur te vorm. Kondensasie van propioniel-KoA met 3-metieloksaalasynsuur kan dimetielsitroensuur deur 'n soortgelyke reaksie vorm.

3-Metieloksaalasynsuur word waarskynlik deur pirovaatkarboksilase sowel as spontane dekarboksilering, na 2-ketobottersuur gedekarboksileer, wat deur 2-ketobottersuur-dehidrogenase na propioniel-KoA gemetaboliseer word. Laasgenoemde word deur propioniel-KoA-karboksilase via die normale metabolisme na suksiniel-KoA omvorm. Hierdie weg is nie in propioonasidemie van belang nie aangesien die metaboliese blok by propioniel-KoA-karboksilase, asook die inhibisie van pirovaatkarboksilase in propioonasidemie (Chan & Freedland, 1972:539) die weg onderdruk.

Dit is belangrik om daarop te let dat sitramaliensuur volgens die resultate van hierdie studie nie deur die katabolisme van metielsuksiensuur ontstaan soos voorgestel is nie. Dit blyk dat die konsentrasies van sitramaliensuur veral gedurende ketoasidotiese periodes in pasiënte met propioonasidemie verhoog is. Die verbinding kan nie gekataboliseer word nie en mag met klinies-biochemiese beelde soos ketoasidose by hierdie defek verband hou. Die bevindings van hierdie studie stel eerder voor dat sitramaliensuur deur die ketogeneseweg in propioonasidemie gevorm word. Volgens hierdie voorstelling kan laktiel-KoA of piroviel-KoA met asetiel-KoA kondenseer, in 'n reaksie met 3-hidroksi-3-metielglutariel-KoA-sintetase. Die teenwoordigheid van 2,3-dimetielappelsuur (2-hidroksi-2,3-dimetielsuksiensuur) in die urien van propioonasidemiepasiënte het hierdie voorstelling ondersteun. 2,3-Dimetielappelsuur word moontlik deur 'n soortgelyke reaksie, met propioniel-KoA as substituuat vir asetiel-KoA, gevorm.

5.4 GEVOLGTREKKING

Die moontlike effek van metielsuksiensuur en kataboliese produkte

Aangesien L-metielsuksiensuur waarskynlik volledig afgebreek word, het dit op sigself moontlik geen kliniese effek nie. Dit is egter wel moontlik dat die kataboliese produkte van L-metielsuksiensuur kliniese gevolge mag toon. Mesakonsuur is volgens Hill en Bradshaw (1969:99) 'n inhibeerder van fumarase, wat impliseer dat die verdere verloop

van die Krebs siklus geïnhibeer kan word. Die effek hiervan mag tot hipoglukemie en ketoasidose asook hiperammonemie bydra. 3-Metieloksaal-asynsuur mag sitraatsintetase inhibeer en deur gevolglike onderdrukking van die Krebs siklus tot ketoasidose en hipoglukemie aanleiding gee. Metielsitroensuur inhibeer sitraatsintetase, akonitase en isositraatdehidrogenase, wat ook tot hierdie simptome kan bydra (Cheema-Dhadli *et al.*, 1975:905). 1,3-Dimetsitroensuur mag dieselfde effekte as metielsitroensuur toon.

Sitramaliensuur (2-metielappelsuur) en 2,3-dimetielappelsuur mag malaatdehidrogenase inhibeer en deur verlaagde oksaal-asynsuurvlakke tot hipoglukemie, ketoasidose en hiperammonemie aanleiding gee.

D-Metieluksiensuur, wat nie verder gekataboliseer kan word nie, mag akkumuleer en kliniese gevolge soos hipoglukemie, asidose en hiperammonemie tot gevolg hê soos in Hoofstuk 2 bespreek is.

Dit is belangrik om daarop te let dat 'n enkele verbinding nie uitgesonder kan word as die oorsaak van 'n spesifieke kliniese simptome nie. Die kliniese beeld kan deur 'n verskeidenheid faktore veroorsaak word.

5.5 SLOTBESKOUIING

Ten slotte kan die volgende aanbevelings vir toekomstige studies gedoen word:

1. Die identiteit van die isomere van metieluksiensuur in glutaarsuururie tipe II en etielmaloniel-adipiensuururie moet bepaal word. Sodoende kan 'n aanduiding verkry word of die produksie van metieluksiensuur deur karboksilering stereospesifiek plaasvind of nie.
2. Die moontlike inhibisie van malaatdehidrogenase deur sitramaliensuur en 2,3-dimetielappelsuur moet ensiemkineties ondersoek word en die toepaslike parameters bepaal word. Sodanige ondersoeke sal veral lig werp op die tipe inhibisie wat plaasvind. Dit sal van waarde wees in die beplanning van

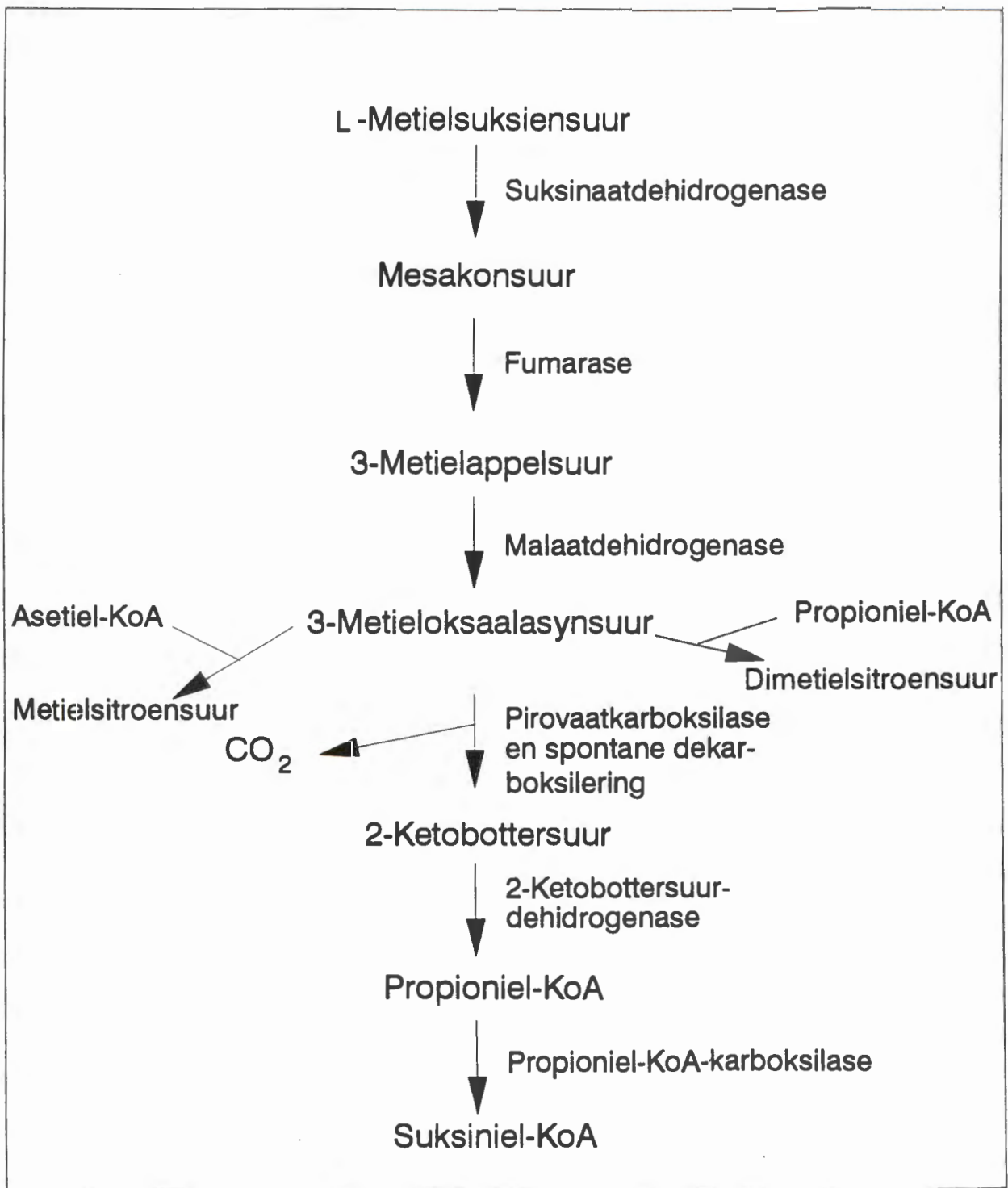
terapeutiese maatreëls. Die terapeutiese gebruik van L-appelsuur kan moontlik hier van waarde wees. Die volgende meganismes mag ter sprake wees:

- 2.1 appelsuur stimuleer die uitfluks van suksiensuur, sitroensuur of 2-ketoglutaarsuur uit die mitochondria. Hierdeur word propioniel-KoA-katabolisme verhoog (Matsuishi *et al.*, 1991:177) sodat minder daarvan beskikbaar is vir die produksie van metielsitroensuur, 1,3-dimetielsitroensuur en 2,3-dimetiellappelsuur;
- 2.2 appelsuur verhoog oksaalasynsuurvlakke (Matsuishi *et al.*, 1991:181) wat moontlik kan bydra om ketoasidose en hipoglukemie op te hef. Dit sal egter ook tot 'n verhoogde produksie van metielsitroensuur lei, wat soos reeds vermeld is, die teenoorgestelde effek mag hê en
- 2.3 wanneer appelsuur in hoër konsentrasies as sitramaliensuur en 2,3-dimetiellappelsuur teenwoordig is sal appelsuur by voorkeur deur malaatdehidrogenase gemetaboliseer word, mits kompeterende inhibisie betrokke is. Met hoër konsentrasies appelsuur sal meer daarvan, in plaas van sitramaliensuur en 2,3-dimetiellappelsuur, ook waarskynlik deur die malaattransporteerder opgeneem kan word.
3. Die volledige kataboliese weg van metielsuksiensuur in die mens moet deur middel van stabiele isotoopmerkingsanalises in 'n geskikte mensmodel opgeklar word. Metielsuksiensuur word moontlik deur fumarase, malaatdehidrogenase en pirovaatkarboksilase tot piroviensuur en CO₂ geoksideer.
4. Die voorgestelde vorming van sitramaliensuur deur die 3-HMG-KoA-sintetasestap van die ketogeneseweg moet ensiematies ondersoek word. Die sintetase-ensiem is nie kommersieël beskikbaar nie en sal uit lewerweefsel geïsoleer moet word.
5. Urienmonsters van pasiënte met die volgende defekte moet vir die voorkoms van metielsuksiensuur, metielfumaarsuur, sitrakonsuur, 3-metiellappelsuur, 3-metieloksaalasynsuur, metielsitroensuur en sitramaliensuur ondersoek word:

- 5.1 Defekte van die leusienkatabolisme: 3-metielglutakoniël-KoA-hidratasedefek, 3-hidroksi-3-metielglutaarsuururie, 3-metielkrotoniëlgliësenurie en meervoudige karboksilasedefek;
- 5.2 defekte van die isoleusienkatabolisme: 2-metielasetoasetiël-KoA-tiolasedefek, metiëlmaloniël-KoA-mutasedefek en meervoudige karboksilasedefek;
- 5.3 defekte van die ketoonliggaammetabolisme: 2-metielasetoasetiël-KoA-tiolasedefek en
- 5.4 4-hidroksibottersuururie. Sitramaliënsuur is reeds in hierdie defek geïdentifiseer (Onkenhout *et al.*, 1989:195).

Metiëlsuksiënsuur word by hierdie defekte verwag omdat dit die katabolisme van vetsure, isoleusien en leusien betrek, wat op verskillende wyses vir die vorming van metiëlsuksiënsuur verantwoordelik is (Hoofstuk 2).

- 6. Indien bogenoemde ondersoeke, veral dié in punte 1 en 2 hierbo genoem, die verwagte resultate oplewer, sal terapeutiese maatreëls vir pasiënte met die defekte in punt 4 moontlik beplan kan word, asook vir pasiënte met isovaleriaanasidemie, propioonasidemie, 2-metielasetoasetiël-KoA-tiolasedefek, glutaarsuururie tipe II en etiëlmaloniël-adipiënsuururie, wat in hierdie studie ondersoek is.
- 7. Daar is nog baie onduidelikhede aangaande die klinies-biochemiese verwantskappe ten opsigte van geïnduseerde metaboliëte en 'n wye verskeidenheid studies kan oor hierdie aangeleentheid geloods word.



Figuur 5.1 Die katabolisme van metielsuksiensuur volgens hierdie studie.

HOOFSTUK 6
LITERATUURVERWYSINGS

AMENDT, B.A., FRENEAUX, E., REECE, C., WOOD, P.A. & RHEAD, W.J. 1992. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase activity, antigen, and biosynthesis are absent in the BALB/cByJ mouse. *Pediatric Research*, 31(6):552-556.

AMENDT, B.A., GREENE, C., SWEETMAN, L., CLOHERTY, J., SHIH, V., MOON, A., TEEL, L. & RHEAD, W.J. 1987. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. Clinical and biochemical studies in two patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 79:1303-1309.

AMENDT, B.A. & RHEAD, W.J. 1986. The multiple acyl-coenzyme A dehydrogenation disorders, glutaric aciduria type II and ethylmalonic-adipic aciduria. Mitochondrial fatty acid oxidation, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, and electron transfer flavoprotein activities in fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 78:205-213.

ANDO, T., KLINGBERG, W.G., WARD, A.N., RASMUSSEN, K. & NYHAN, W.L. 1971. Isovaleric acidemia presenting with altered metabolism of glycine. *Pediatric Research*, 5:478-486.

ARAMAKI, S., LEHOTAY, D., SWEETMAN, L., NYHAN, W.L., WINTER, S.C. & MIDDLETON, B. 1991. Urinary excretion of 2-methylacetoacetate, 2-methyl-3-hydroxybutyrate and tiglylglycine after isoleucine loading in the diagnosis of 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14:63-74.

BANNWART, C., WERMUTH, B., BAUMGARTNER, R., SUORMALA, T. & WIESMANN, U.N. 1992. Isolated biotin-resistant deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase presenting as a clinically severe form in a newborn with fatal outcome. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 15:863-868.

BARASH, V., ELPELEG, O., AMIT, R., GOTTFRIED, S., YATZIV, S. & GUTMAN, A. 1989. Propionic acidemia - biochemical studies. **Israel Journal of Medical Sciences**, 25:103-106.

BARASH, V., MANDEL, H., SELLA, S. & GEIGER, R. 1990. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: biochemical studies and family investigation of four generations. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 13:156-164.

BARKER, H.A. 1969. Citramalate Pyruvate lyase. (In: Lowenstein, J.M. (red.). **Methods in enzymology**. Volume XIII. Citric acid cycle. New York: Academic Press. p 344, 346).

BARKER, H.A., SMYTH, R.D., BRIGHT, H.J., & INGRAHAM, L.L. 1962. β -Methylaspartate from *Clostridium tetanomorphum*. (In: Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (reds.). **Methods in enzymology**. Volume V. New York, London: Academic Press. p 827, 831).

BARSHOP, B.A., YOSHIDA, I., AJAMI, A., SWEETMAN, L., WOLFF, J.A., SWEETMAN, F.R., Prodanos, C., Smith, M. & Nyhan, W.L. 1991. Metabolism of $1\text{-}^{13}\text{C}$ -propionate *in vivo* in patients with disorders of propionate metabolism. **Pediatric Research**, 30(1):15-22.

BEACH, R.L., AOGAICHT., T. & PLAUT, G.W.E. 1977. Identification of D-threo- α -methylisocitrate as stereochemically specific substrate for bovine heart aconitase and inhibitor of TPN-linked isocitrate dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, 252(8):2702-2709.

BEEMER, F.A., BARTLETT, K., DURAN, M., GHNEIM, H.K., WADMAN, S.K., BRUINVIS, L. & KETTING, D. 1982. Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in two sibs. **European Journal of Pediatrics**, 138:351-354.

BELL, R.B., BROWNWLL, A.K.W., ROE, C.R., ENGEL, A.G., GOODMAN, S.I., FRERMAN, F.E., SECCOMBE, D.W. & SNYDER, F.F. 1990. Electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase (ETF:QO) deficiency in an adult. *Neurology*, 40:1779-1782.

BLOM, W., POLDER-MOL, A.C., KELHOLT-DIJKMAN, H.H., HIERCK, L. & HUIJMANS, J.G.M. 1990. The detection of abnormal metabolites in MCAD deficiency: a new method. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13:315-320.

BRANDT, N.J. 1984. Symptoms and signs in organic acidurias. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 7 Suppl. 1:23-27.

BUDD, M.A., TANAKA, K., HOLMES, L.B., EFRON, M.L., CRAWFORD, J.D. & ISSELBACHER, K.J. 1967. Isovaleric acidemia. Clinical features of a new genetic defect of leucine metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 277(7):321-327.

BURLINA, A.B., SHERWOOD, W.G., MARCHIORO, M.V., BERNARDINA, B.D. & GABURRO. 1988. Neonatal screening for biotinidase deficiency in north eastern Italy. *European Journal of Pediatrics*, 147:317-318.

BURLINA, A.B., ZACCHELLO, F., DIONISI-VICI, C., BERTINI, E., SABETTA, G., BENNETT, M.J., HALE, D.E., SCHMIDT-SOMMERFELD, E. & RINALDO, P. 1991. New clinical phenotype of branched-chain acyl-CoA oxidation defect. *The Lancet*, 338:1522-1523.

BURTON, B.K. 1987. Inborn errors of metabolism: the clinical diagnosis in early infancy. *Pediatrics*, 79(3):359-369.

CATZEFLIS, C., BACHMANN, C., HALE, D.E, COATES, P.M., WIESMANN, U., COLOMBO, J.P., JORIS, F. & DÉLÈZE, G. 1990. Early diagnosis and treatment of neonatal medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: report of two siblings. *European Journal of Pediatrics*, 149:577-581.

CHALMERS, R.A. 1989. Current research in the organic acidurias. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 12:225-239.

CHALMERS, R.A. & LAWSON, A.M. 1982. (In: CHALMERS, R.A. & LAWSON, A.M. (eds.). **Organic acids in man. Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias.** New York: Chapman and Hall. p 20, 304).

CHAN, T.M. & FREEDLAND, R.A. 1972. The effect of propionate on the metabolism of pyruvate and lactate in the perfused rat liver. **Biochemical Journal**, 127:539-543.

CHEEMA-DHADLI, S., LEZNOFF, C.C. & HALPERIN, M.L. 1975. Effect of 2-methylcitrate on citrate metabolism: implications for the management of patients with propionic acidemia and methylmalonic aciduria. **Pediatric Research**, 9:905-908.

COATES, P.M., HALE, D.E., FINOCCHIARO, G., TANAKA, K. & WINTER, S.C. 1988. Genetic deficiency of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase in cultured fibroblasts from a patient with muscle carnitine deficiency and severe skeletal muscle weakness. **The Journal of Clinical Investigation**, 81:171-175.

COLEVAS, A.D., EDWARDS, J.L., HRUBAN, R.H., MITCHELL, G.A., VALLE, D. & HUTCHINS, G.M. 1988. Glutaric acidemia type II. Comparison of pathologic features in two infants. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, 112:1133-139.

COX, R.F.B. & McELVAIN, S.M. 1937. Ethyl ethoxalyl propionate. **Organic Synthesis**, 17:272.

CRANE, A.M., MARTIN, L.S., VALLE, D. & LEDLEY, F.D. 1992. Phenotype of disease in three patients with identical mutations in methylmalonyl mutase. **Human Genetics**, 89:259-264.

DEL VALLE, J.A., MERINERO, B., JIMÉNEZ, A., GARCIA, M.J., UGARTE, M., OMEÑACA, F., NEUSTADT, G. & QUERO, J. 1982. Dietary treatment and biochemical studies on a neonatal case of propionyl-CoA carboxylase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 5:121-124.

DURAN, M., BRUINVIS, L., KETTING, D., WADMAN, S.K., VAN PELT, B.C. & BATENBURG-PLENTER, A.M. 1982. Isovaleric acidaemia presenting with dwarfism, cataract and congenital abnormalities. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 5:125-127.

DURAN, M., GOMPERTZ, D., BRUINVIS, L., KETTING, D. & WADMAN, S.K. 1978. The variability of metabolite excretion in propionicacidaemia. **Clinica Chimica Acta**, 82:93-99.

DURAN, M., VAN SPRANG, F.J., DREWES, J.G., BRUINVIS, L., KETTING, D. & WADMAN, S.K. 1979. Two sisters with isovaleric acidaemia, multiple attacks of ketoacidosis and normal development. **European Journal of Pediatrics**, 131:205-211.

DUSHEIKO, G., KEW, M.C., JOFFE, B.I., LEWIN, J.R., MANTAGOS, S. & TANAKA, K. 1979. Recurrent hypoglycemia associated with glutaric aciduria type II in an adult. **The New England Journal of Medicine**, 301:1405-1409.

DUTRA, J.C., DUTRA-FILHO, C.S., CARDOZO, S.E.C., WANNMACHER, C.M.D. SARKIS, J.J.F. & WAJNER, M. 1993. Inhibition of succinate dehydrogenase and β -hydroxybutyrate activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 16:147-153.

DUTRA, J.C., WAJNER, M., WANNMACHER, C.F., DUTRA-FILHO, C.S. & WANNMACHER, C.M.D. 1991. Effects of methylmalonate and propionate on uptake of glucose and ketone bodies *in vitro* by brain of developing rats. **Biochemical Medicine and Metabolic Biology**, 45:56-64.

EGIDIO, R.J., FRANCIS, G.L., COATES, P.M., HALE, D.E. & ROESEL, A. 1989. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *American Family Physician*, 39(5):221-226.

ELPELEG, O.N., CHRISTENSEN, E., HURVITZ, H. & BRANSKI, D. 1990. Recurrent, familial Reye-like syndrome with a new complex amino acid and organic aciduria. *European Journal of Pediatrics*, 149:709-712.

ERASMUS, C., MIENIE, L.J., REINECKE, C.J. & WADMAN, S.K. 1985. Organic aciduria in late-onset biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 8 Suppl. 2:105-106.

ERASMUS, E. 1987. Die gebruik van gaschromatografie, massaspektrometrie en rekenaartegnologie in die identifisering van organiese suururieë. M.Sc-verhandeling. Potchefstroom: PU vir CHO. p 70.

FERRIS, N.J. & TIEN, R.D. 1993. Cerebral MRI in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: case report. *Neuroradiology*, 35:559-560.

FINNIE, M.D.A., COTTRALL, K., SEAKINS, J.W.T. & SNEDDEN, W. 1976. Massive excretion of 2-oxoglutaric acid and 3-hydroxyisovaleric acid in a patient with a deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. *Clinica Chimica Acta*, 171:95-102.

FRENEAUX, E., SHEFFIELD, V.C., MOLIN, L., SHIRES, A. & RHEAD, W.J. 1992. Glutaric acidemia type II. Heterogeneity in β -oxidation flux, polypeptide synthesis, and complementary DNA mutations in the α subunit of electron transfer flavoprotein in eight patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 90:1679-1686.

GERDES, A.-M., GREGERSEN, N., LÚDVISSON, P. & GÜTTLER, F. 1988. A Scandinavian case of isovaleric acidemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 11:219-220.

GIBSON, K.M., BREUER, J., KAISER, K., NYHAN, W.L., McCoY, E.E., FERREIRA, P., GREENE, C.L., BLITZER, M.G., SHAPIRA, E., REVERTE, F., CONDE, C., BAGNELL, P. & COLE, D.E.C. 1988. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: report of five new patients. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 11:76-87.

GIBSON, K.M., BREUER, J. & NYHAN, W.L. 1988. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. **European Journal of Pediatrics**, 148:180-186.

GIBSON, K.M., ELPELEG, O.N., JAKOBS, C., COSTEFF, H. & KELLEY, R.L. 1993. Multiple syndromes of 3-methylglutaconic aciduria. **Pediatric Neurology**, 9(2):120-123.

GIBSON, K.M., GOODMAN, S.I., FRERMAN, F.E. & GLASGOW, A.M. 1989. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency associated with combined 4-hydroxybutyric and dicarboxylic acidurias: potential for clinical misdiagnosis based on urinary organic acid profiling. **The Journal of Pediatrics**, 114(4):607-610.

GIBSON, K.M., HOFFMANN, G., NYHAN, W.L., ARAMAKI, S., THOMPSON, J.A., GOODMAN, S.I., JOHNSON, D.A. & FIFE, R.R. 1988. 4-Hydroxybutyric aciduria in a patient without ataxia or convulsions. **European Journal of Pediatrics**, 147:529-531.

GIBSON, K.M., LEE, C.F., CHAMBLISS, K.L., KAMALI, V., FRANCOIS, B., JAEKEN, J. & JAKOBS, C. 1991. 4-Hydroxybutyric aciduria: application of a fluorometric assay to the determination of succinic semialdehyde dehydrogenase activity in extracts of cultured human lymphoblasts. **Clinica Chimica Acta**, 196:219-222.

GIORGIO, A.J. 1976. Letter to the Editor. **The New England Journal of Medicine**, 295(20):1137

GOMPERTZ, D., BARTLETT, K., BLAIR, D. & STERN, C.M.M. 1973. Child with a defect in leucine metabolism associated with β -hydroxyisovaleric aciduria and β -methylcrotonylglycinuria. *Archives of Disease in Childhood*, 48:975-977.

GOODMAN, S.I. & GREENE, C.L. 1991. Inborn errors as causes of acute disease in infancy. *Seminars in Perinatology*, 15(1) Suppl. 1:31-34.

GOODMAN, S.I., McCABE, E.R.B., FENNESSEY, P.V. & MACE, J.W. 1980. Multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency (glutaric aciduria type II) with transient hypersarcosinemia and sarcosinuria; possible inherited deficiency of an electron transfer flavoprotein. *Pediatric Research*, 14:12-17.

GREEN, A., MARSHALL, T.G., BENNETT, M.J., GRAY, R.G.F. & POLLITT, R.J. 1985. Riboflavin-responsive ethylmalonic-adipic aciduria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 8:67-70.

GREGERSEN, N. 1985. The acyl-CoA dehydrogenation deficiencies. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 45 Suppl 174:1-60.

GREGERSEN, N., KØLVRAA, S., RASMUSSEN, K., MORTENSEN, P.B., DIVRY, P., DAVID, M. & HOBOLTH, N. 1983 General (medium-chain) acyl-CoA dehydrogenase deficiency (non-ketotic dicarboxylic aciduria): quantitative urinary excretion pattern of 23 biologically significant organic acids in three cases. *Clinica Chimica Acta*, 132:181-191.

GREGERSEN, N., LAURITZEN, R. & RASMUSSEN, K. 1976. Suberylglycine excretion in the urine from a patient with dicarboxylic aciduria. *Clinica Chimica Acta*, 70:417-425.

GREGERSEN, N., WINTER, V., CURTIS, D., DEUFEL, T., MACK, M., HENDRICKX, J., WILLEMS, P.J., PONZONE, A., PARRELLA, T., PONZONE, R., DING, J., ZHANG, W., TSANG CHEN, Y., KAHLER, S., ROE, C.R., KØLVRAA, S., SCHNEIDERMAN, K., ANDRESEN, B.S., BROSS, P. & BOLUND, L. 1993. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: the prevalent mutation G985 (K304E) is subject to a strong founder effect from Northwestern Europe. **Human Heredity**, 43:342-350.

GREGERSEN, N., WINTZENSEN, H., KØLVRAA, S., CHRISTENSEN, E., CHRISTENSEN, M.F., BRANDT, N.J. & RASMUSSEN, K. 1982. C6-C10-Dicarboxylic Aciduria: investigations of a patient with riboflavin responsive multiple acyl-CoA dehydrogenation defects. **Pediatric Research**, 16:861-868.

GRETER, J., LINDSTEDT, S., SEEMAN, H. & STEEN, G. 1980. 2-Hydroxy-2-methylsuccinic acid - a urinary metabolite in propionyl-CoA carboxylase deficiency. **Clinica Chimica Acta**, 106:103-105.

GRITZELMANN, R., STEINMANN, B., NIEDERWIESER, N., FANCONI, S., SUORMALA, T. & BAUMGARTNER, R. 1987. Isolated (biotin-resistant) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting at age 20 months with sopor, hypoglycemia and ketoacidosis. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 10 Suppl. 2:290-292.

HALPERIN, M.L., SCHILLER, C.M. & FRITZ, I.B. 1971. The inhibition by methylmalonic acid of malate transport by the dicarboxylate carrier in rat liver mitochondria. A possible explanation for hypoglycemia in methylmalonic aciduria. **The Journal of Clinical Investigation**. 50:2276-2282.

HARPEY, J., CHARPENTIER, C., COUDÉ, M., DIVRY, P. & PATURNEAU-JOUAS, M. 1987. Sudden infant death syndrome and multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency, ethylmalonic-adipic aciduria, or systemic carnitine deficiency. **The Journal of Pediatrics**, 110(6):881-884.

HENDERSON, H.E., BALLA, R., DE JONG, G., PIEK, C.J., MIENIE, L.J. & ERASMUS, E. 1987. Postnatal and antenatal laboratory diagnosis of glutaric aciduria type II in a South African family. *South African Medical Journal*, 71:589-591.

HILL, R.L. & BRADSHAW, R.A. 1969. Fumarase. (In: Lowenstein, J.M. (red.). *Methods in enzymology*. Volume XIII. Citric acid cycle. New York: Academic Press. p 97-99).

HILL, R.L. & TEIPEL, J.W. 1971. Fumarase and crotonase. (In: Boyer, P.D. (red.). *The enzymes*. Volume V. Hydrolysis: sulphate esters, carboxyl esters, glycosides. *Derde uitgawe*. New York, London: Academic Press. p 557).

HOFFMANN, G.F., HUNNEMAN, D.H., JAKOBS, C., WILICHOWSKI, E., EBER, S.W., HANEFELD, F., RATING, D. & REICHMANN, H. 1990. Progressive fatal pancytopenia, psychomotor retardation and muscle carnitine deficiency in a child with ethylmalonic aciduria and ethylmalonic acidaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 13:337-340.

HSIANG, M.W. & BRIGHT, H.J. 1969. β -Methylaspartate from *Clostridium tetanomorphum*. (In: Lowenstein, J.M. (red.). *Methods in enzymology*. Volume XIII. Citric acid cycle. New York: Academic Press. p 347).

HYMAN, D.B. & TANAKA, K. 1986. Isovaleryl-CoA dehydrogenase activity in isovaleric acidemia fibroblasts using an improved tritium release assay. *Pediatric Research*, 20(1):59-61.

INOUE, F., TERADA, N., NUKINA, S., KODO, N., KINUGASA, A. & SAWADA, T. 1993. Methylmalonic aciduria with pathological fracture. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16:1052-1053.

JAKOBS, C., MICHAEL, T., JAEGER, E., JAEKEN, J. & GIBSON, K.M. 1992. Further evaluation of Vigabratin therapy in 4-hydroxybutyric aciduria. **European Journal of Pediatrics**, 466-468.

JAKOBS, C., SMIT, L.M.E., KNEER, J., MICHAEL, T. & GIBSON, K.M. 1990. The first adult case of 4-hydroxybutyric aciduria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 13:341-344.

KAMERLING, J.P., DURAN, M., GERWIG, G.J., KETTING, D., BRUINVIS, L., Vliegenthart, J.F.G. & WADMAN, S.K. 1981. Determination of the absolute configuration of some biologically important urinary 2-hydroxydicarboxylic acids by capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 222:276-283.

KAZIRO, Y. & OCHOA, S. 1964. The metabolism of propionic acid. **Advanced Enzymology**, 26:283.

KOHLSCHÜTTER, A. 1983. The clinical presentation of organoacidopathies - when to investigate. **Neuropediatrics**, 14:191-196.

KUHARA, T., SHINKA, T., MATSUDA, M. & MATSUMOTO, I. 1982. Increased excretion of lactate, glutarate, 3-hydroxyisovalerate and 3-methylglutaconate during clinical episodes of propionic acidemia. **Clinica Chimica Acta**, 123:101-109.

KURCZYNSKI, T.W., HOPPEL, C.L., GOLDBLATT, P.J. & GUNNING, W.T. 1989. Metabolic studies of carnitine in a child with propionic acidemia. **Pediatric Research**, 26(1):63-66.

LARDY, H.A. 1969. The metabolism of itaconate and mesaconate in mammalian liver. (In: Lowenstein, J.M. (red.). *Methods in enzymology*. Volume XIII. Citric acid cycle. New York: Academic Press. p 314-319).

LEHNERT, W. 1981. 3-Hydroxyisoheptanoic acid: a new metabolite in isovaleric acidemia. **Clinica Chimica Acta**, 113:101-103.

LEHNERT, W. 1981. Excretion of N-isovalerylglutamic acid in isovaleric acidemia. **Clinica Chimica Acta**, 116:249-252.

LEHNERT, W. 1983. N-isovalerylalanine and N-isovalerylsarcosine: two new minor metabolites in isovaleric acidemia. **Clinica Chimica Acta**, 134:207-212.

LEHNERT, W. & Niederhoff, H. 1981. 4-Hydroxyisovaleric acid: a new metabolite in isovaleric acidemia. **European Journal of Pediatrics**, 136:281-283.

LEONARD, J.V., MIDDLETON, B. & SEAKINS, J.W.T. 1987. Acetoacetyl CoA thiolase deficiency presenting as ketotic hypoglycemia. **Pediatric Research**, 21:211-213.

LOEHR, J.P., GOODMAN, S.I. & FRERMAN, F.E. 1990. Glutaric acidemia type II: heterogeneity of clinical and biochemical phenotypes. **Pediatric Research**, 27(3):311-315.

LOSADA, M., TREBSTM, A.V., OGATA, S. & ARNON, D.I. 1960. Equivalence of light and adenosine triphosphate in bacterial photosynthesis. **Nature**, 185(4727):753-760.

MANDEL, H., Africk, D., Blitzer, M. Shapira, E. 1988. The importance of recognizing secondary carnitine deficiency in organic acidaemias: case report in glutaric acidaemia type II. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 11:397-402.

MANTAGOS, S., GENEL, M. & TANAKA, K. 1979. *In vivo* and *in vitro* studies indicating deficiency of activities of multiple acyl-CoA dehydrogenases. **The Journal of Clinical Investigation**, 64:1580-1589.

- MARCELL, P.D., STABLER, S.P., PODELL, E.R. & ALLEN, R.H. 1985. Quantitation of methylmalonic acid and other dicarboxylic acids in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, 150:58-66.
- MATSUISHI, T., STUMPF, D.A. & CHRISLIP, K. 1991. The effect of malate on propionate mitochondrial toxicity. **Biochemical Medicine and Metabolic biology**, 46:177-184.
- MERINERO, B., PÉREZ-CERDÁ, C., GARCÍA, M.J., CARRASCO, S., LAMA, R., UGARTE, M. & MIDDLETON, B. 1987. β -ketothiolase deficiency: two siblings with different clinical conditions. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 10 Suppl. 2:276-278.
- MICHALSKI, A.J., BERRY, G.T. & SEGAL, S. 1989. Holocarboxylase synthetase deficiency: 9-year follow-up of a patient on chronic biotin therapy and a review of the literature. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 12:312-316.
- MIDDLETON, B. 1987. Identification of heterozygotes for the defect of mitochondrial 3-ketoacyl-CoA thiolase causing 2-methyl-3-hydroxybutyric aciduria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 10 Suppl 2:270-272.
- MIDDLETON, B. & BARTLETT, K. 1983. The synthesis and characteristics of 2-methylacetoacetyl coenzyme A and its use in the identification of the site of the defect in 2-methylacetoacetic and 2-methyl-3-hydroxybutyric aciduria. **Clinica Chimica Acta**, 128:291-305.
- MIENIE, L.J. 1994. 'n Studie van geïnduseerde metaboliese weë weens 'n aangebore defek in propioniel-KoA-karboksilase. Ph.D-proefskrif. Potchefstroom: PU vir CHO. p 172, 202, 260.

MITCHELL, G., OGIER, H., MUNNICH, A., SAUDUBRAY, J.M., SHIRER, J., CHARPENTIER, C. & ROCCHICCIOLI, F. 1986. Neurological deterioration and lactic acidemia in biotinidase deficiency. A treatable condition mimicking Leigh's disease. *Neuropediatrics*, 17:129-131.

MONTGOMERY, J.A., MAMER, O.A. & SCRIVER, C.R. 1983. Metabolism of ethylmalonate to mesaconate in the rat. Evidence for *trans*-dehydrogenation of methylsuccinate. *Biochemical Journal*, 214:641-644.

MOOY, P.D., PRZYREMBEL, H., GIESBERTS, M.A.H., SCHOLTE, H.R., BLOM, W. & GELDEREN, H.H. 1984. Glutaric aciduria type II: treatment with riboflavin, carnitine and insulin. *European Journal of Pediatrics*, 143:92-95.

MORROW, G. 1974. Methylmalonic acidemia. (In: Nyhan, W.L. & Wiley, A. (eds.). *Heritable disorders of amino acid metabolism*. New York, London, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons, Inc. p 69).

MUNNICH, A., SAUDUBRAY, J.M., COTISSON, A., COUDÉ, F.X., OGIER, H., CHARPENTIER, C., MARSAC, C., CARRÉ, G., BOURGEAY-CAUSSE, M. & FRÉZAL, J. 1981. Biotin dependent multiple carboxylase deficiency presenting as a congenital lactic acidosis. *European Journal of Pediatrics*, 137:203-206.

NAGASAWA, H., YAMAGUCHI, S., ORII, T., SCHUTGENS, R.B.H., SWEETMAN, L. & HASHIMOTO, T. 1989. 3-Ketothiolase deficiency: heterogeneity in a defect of mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase biosynthesis in fibroblasts from four patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 12:368-372.

NAKAMURA, E., ROSENBERG, L.E. & TANAKA, K. 1976. Microdetermination of methylmalonic and other short chain dicarboxylic acids by gas chromatography: use in prenatal diagnosis of methylmalonic acidemia and in studies of isovaleric acidemia. *Clinica Chimica Acta*, 68:127-140.

- NARISAWA, K., ARAI, N., IGARASHI, Y., TADA, K. & HIROOKA, Y. 1982. Clinical and biochemical findings on a child with multiple biotin-responsive carboxylase deficiencies. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 5:67-68.
- NAYLOR, G., SWEETMAN, L., NYHAN, W.L., GRIFFITHS, J., MÖRCH, L. & BRANDÄNGE, S. 1980. Isotope dilution analysis of methylcitric acid in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of propionic and methylmalonic acidemia. **Clinica Chimica Acta**, 107:175.
- NYHAN, W.L. 1988. Abnormalities of fatty acid oxidation. **The New England Journal of Medicine**, 319(20):1344-1346.
- NYHAN, W.L. 1988. Inborn errors of biotin metabolism. **Archives in Dermatology**, 123:1696-1698a.
- NYHAN, W.L. 1988. Multiple carboxylase deficiency. **International Journal of Biochemistry**, 20(4):363-370.
- OHURA, T., MIYABAYASHI, S., NARISAWA, K. & TADA, K. 1991. Genetic heterogeneity of propionic acidemia: analysis of 15 Japanese patients. **Human Genetics**, 87:41-44.
- OHURA, T., NARISAWA, K. & TADA, K. 1993. Propionic acidemia: sequence analysis of mutant mRNAs from Japanese β subunit-deficient patients. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 16:863-867.
- ONKENHOUT, W., MAASWINKEL-MOOIJ, P.D. & POORTHUIS, B.J.H.M. 1989. 4-Hydroxybutyric aciduria: further clinical heterogeneity in a new case. **European Journal of Pediatrics**, 149:194-196.

- OZAND, P.T., AL AQEEL, A., GASCON, G., BRISMAR, J., THOMAS, E. & GLEISPACH, H. 1991. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) lyase deficiency in Saudi Arabia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14:174-188.
- PATEL, M.S., OWEN, O.E. & RAEFSKY, C. 1976. Effect of methylmalonate in ketone body metabolism in developing rat brain. *Life Sciences*, 19:41-48.
- PATTARELLI, P.P., NYHAN, W.L. & GIBSON, K.M. 1988. Oxidation of [U¹⁴C]succinic semialdehyde in cultured human lymphoblasts: measurement of residual succinic semialdehyde dehydrogenase activity in 11 patients with 4-hydroxybutyric aciduria. *Pediatric Research*, 24(4):455-460.
- PERPER, J.A. & AHDAB-BARMADA, M. 1992. Fatty liver, encephalopathy, and sudden unexpected death in early childhood due to medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 13(4):329-334.
- PESCE, F., CERONE, R., CARUSO, U. & ROMANO, C. 1991. Acute neonatal isovaleric acidaemia presented without acidosis or ketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14:111.
- PETTERSEN, J.E. & STOKKE, O. 1973. Branched short-chain dicarboxylic acids in human urine. *Biochimica et Biophysica Acta*, 304:316-325.
- PITT, J.J. 1993. Novel glycine conjugates in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16:392-398.
- POLLITT, R.J. 1989. Disorders of mitochondrial β -oxidation: Prenatal and early postnatal diagnosis and their relevance to Reye's syndrome and sudden infant death. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 12:215-230.

- POWLOWSKI, J.B. & DAGLEY, S. 1985. β -Ketoacid pathway in *Trichosporon cutaneum* modified for methyl-substituted metabolites. **Journal of Bacteriology**, 163(3):1126-1135.
- RABIN, R., REEVES, H.C., WEGENER, W.S., MEGRAW, R.E. & AJI, S.J. 1965. Glyoxalate in fatty-acid metabolism. Condensations of glyoxalate with fatty acids lead to alternate pathways of fatty-acid metabolism. **Science**, 150:1548-1558.
- RATING, D., HANEFELD, F., SIEMENS, H., KNEER, J., JAKOBS, C., HERMIER, M. & DIVRY, P. 1984. 4-Hydroxybutyric aciduria: a new inborn error of metabolism. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 7 Suppl. 1:90-96.
- RHEAD, W.J. & AMENDT, B.A. 1984. Electron-transferring flavoprotein deficiency in the multiple acyl-CoA dehydrogenation disorders, glutaric aciduria type II and ethylmalonic-adipic aciduria. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 7 Suppl. 2:99-100.
- RHEAD, W.J., WOLFF, J.A., LIPSON, M., FALACE, P., DESAI, N., FRITCHMAN, K., MOON, A. & SWEETMAN, L. 1987. Clinical and biochemical variation and family studies in the multiple acyl-CoA dehydrogenation disorders. **Pediatric Research**, 21(4):371-376.
- RINALDO, P., WELCH, R.D., PREVIS, S.F. SCHMIDT-SOMMERFELD, E., GARGUS, J.J., O'SHEA, J.J. & ZINN, A.B. 1991. Ethylmalonic/adipic aciduria: effects of oral medium-chain triglycerides, carnitine, and glycine on urinary excretion of organic acids, acylcarnitines, and acylglycines. **Pediatric Research**, 30(3):216-220.
- RIUDOR, E., VILASECA, M.A., BRIONES, P., RIBES, A., SUÑÉ, J., MARTORELL, R., MACAYA, A., ROIG, M. & BALLABRIGA, A. 1989. Requirement of high biotin doses in a case of biotinidase deficiency. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 12:338-339.

RODWELL, V.W. 1990. Catabolism of the carbon skeletons of amino acids. (In: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. & Rodwell, V.W. (reds.). Harper's biochemistry. Een-en twintigste uitgawe. Prentice-Hall International Inc. p 284).

ROE, C.R. & COATES, P.M. 1989. Acyl-CoA-dehydrogenase deficiencies. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (reds.). The metabolic basis of inherited disease I. Sesde uitgawe. New York: McGraw-Hill. p 889-910).

ROLLAND, M.O., DIVRY, P., ZABOT, M.T., GUIBAUD, P., GOMEZ, S., LACHAUX, A. & LORAS, I. 1991. Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 16-month-old child. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14:838-839.

ROSENBERG, L.E. & FENTON, W.A. 1989. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (reds.). The metabolic basis of inherited disease I. Sesde uitgawe. New York: McGraw-Hill. p 821-844).

SAUDUBRAY, J.M., OGIER, H., BONNEFONT, J.P., MUNNICH, A., LOMBES, A., HERVÉ, F., POLL THÉ, B., SPECOLA, N., PARVY, P., BARDET, J., RABIER, D., COUDÉ, M., CHARPENTIER, C. & FRÉZAL, J. 1989. Clinical approach to inherited metabolic diseases in the neonatal period: a 20-year survey. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 12 Suppl. 1:25-41.

SCHMIDT-SOMMERFELD, E., PENN, D., RINALDO, P., KOSSAK, B.D., LI, B.U.K., HUANG, Z. & GAGE, D.A. 1992. Urinary medium-chain acylcarnitines in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency, medium-chain triglyceride feeding and valproic acid therapy: sensitivity and specificity of the radioisotopic exchange/high performance liquid chromatography method. *Pediatric Research*, 31:545-551.

SCRUTTON, M.C., OLMSTED, M.R. & UTTER, M.F. 1969. Pyruvate carboxylase from chicken liver. (In: Lowenstein, J.M. (red.). *Methods in enzymology*. Volume XIII. Citric acid cycle. New York: Academic Press. p 235, 245-246).

SEASHORE, M.R. & RINALDO, P. 1993. Metabolic disease of the neonate and young infant. *Seminars in Perinatology*, 17(5):318-329.

SEWELL, A.C., HERWIG, J., BÖHLES, H., RINALDO, P., BHALA, A. & HALE, D.E. 1993. A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with isolated ethylmalonic aciduria. *European Journal of Pediatrics*, 152:922-924.

SHAPIRA, S.K., LEDLEY, F.D., ROSENBLATT, D.S. & LEVY, H.L. 1991. Ketoacidotic crisis as a presentation of mild ('benign') methylmalonic acidemia. *The Journal of Pediatrics*, 119(1):80-84.

SHAPIRO, L.J., BOCIAN, M.E., RAIJMAN, L., CEDERBAUM, S.D. & SHAW, K.N.F. 1978. Methylmalonyl-CoA mutase deficiency associated with severe neonatal hyperammonemia: activity of urea cycle enzymes. *The Journal of Pediatrics*, 93:987-988.

SHEVELL, M.I., MATIAZUK, N., LEDLEY, F.D. & ROSENBLATT, D.S. 1993. Varying neurological phenotypes among *mut*^o and *mut*⁻ patients with methylmalonyl-CoA mutase deficiency. *American Journal of Medical Genetics*, 45:619-624.

SHIGEMATSU, Y., KIKAWA, Y., SUDO, M., KIKUCHI, K., OHTA, S. & OKAMOTO, M. 1983. A simple method of determining 4-hydroxyisovaleric acid and its level in a patient with isovaleric acidemia. *Clinica Chimica Acta*, 134:201-204.

SHIGEMATSU, Y., SUDO, M., MOMOI, T., INOUE, Y., SUZUKI, Y. & KAMEYAMA, J. 1982. Changing plasma and urinary organic acid levels in a patient with isovaleric acidemia during an attack. *Pediatric Research*, 16:771-775.

- SORIANO, J.R., TAITZ, L.S., FINBERG, L. & EDELMANN, C.M. 1967. Hyperglycinemia with ketoacidosis and leukopenia. *Metabolic studies on the nature of the defect. Pediatrics*, 39(6):818-828.
- SØVIK, O. 1993. Mitochondrial 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency: An inborn error of isoleucine and ketone body metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 16:46-54.
- SØVIK, O., SAUDUBRAY, J.M., MUNNICH, A. & SWEETMAN, L. 1992. Genetic complementation analysis of mitochondrial 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency in cultured fibroblasts. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 15:359-362.
- STACEY, T.E., DE SOUSA, C., TRACEY, B.M., WHITELOW, A., MISTRY, J., TIMBRELL, P. & CHALMERS, R.A. 1985. Dizygotic twins with 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria: unusual presentation, family studies and dietary management. *European Journal of Pediatrics*, 144:177-181.
- STORK, L.C., AMBRUSO, D.R., WALLNER, S.F., SAMBRANO, J.E., MOSCINSKI, L.C., WILSON, H.L. & McCABE, E.R.B. 1986. Pancytopenia in propionic acidemia: Hematologic evaluation and studies of hematopoiesis *in vitro*. *Pediatric Research*, 20(8):783-788.
- SWEETMAN, L. 1981. Two forms of biotin-responsive multiple carboxylase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 4:53-54.
- SWEETMAN, L. 1989. Branched chain organic acidurias. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (eds.). *The metabolic basis of inherited disease I*. Sesde uitgawe. New York: McGraw-Hill. p 791-820).
- TANAKA, K., MANTAGOS, S., GENEL., SEASHORE, M.R., BILLINGS, B.A. & BARETZ, B.H. 1977. New defect of fatty-acid metabolism with hypoglycaemia and organic aciduria. *The Lancet*, 2:986-987.

TAUBMAN, B., HALE, D.E. & KELLEY, R.I. 1987. Familial Reye-like syndrome: a presentation of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatrics*, 79(3):382-385.

TAVARES DE ALMEIDA, I., DURAN, M., SILVA, M.F.B., PORTELA, R., CABRAL, A., TASSO, T., EUSÉBIO, F. & SILVEIRA, C. 1991. Mild form of methylmalonic aciduria misdiagnosed as propionic acidemia during a ketotic crisis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 14:259-262.

THOMPSON, G.N. 1992. Inborn errors of propionate metabolism: Methylmalonic and propionic acidemias. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 28:134-135.

THOMPSON, G.N. & CHALMERS, R.A. 1990. Increased urinary metabolite excretion during fasting in disorders of propionate metabolism. *Pediatric Research*, 27(4):413-416.

THOMPSON, G.N., CHALMERS, R.A. & HALLIDAY, D. 1990. The contribution of protein catabolism to metabolic decompensation in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria. *European Journal of Pediatrics*, 149:346-350.

THOMPSON, G.N., CHALMERS, R.A., WALTER, J.H., BRESSON, J.L., LYONNET, S.L., REED, P.J., SAUDUBRAY, J.M., LEONARD, J.V. & HALLIDAY, D. 1990. The use of metronidazole in management of methylmalonic and propionic acidemias. *European Journal of Pediatrics*, 149:792-796.

TOUMA, E.H. & CHARPENTIER, C. 1992. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Archives of Disease in Childhood*, 67:142-145.

TRUSCOTT, R.J.W., MALEGAN, D., McCAIRNS, E., BURKE, D., HICK, L., SIMS, P., HALPERIN, B., TANAKA, K., SWEETMAN, L., NYHAN, W.L., HAMMOND, J., BUMACK, C., HAAN, E.A. & DANKS, D.M. 1981. New metabolites in isovaleric acidemia. *Clinica Chimica Acta*, 110:187-203.

TSAI, M.Y., JOHNSON, D.D., SWEETMAN, L. & BERRY, S.A. 1989. Two siblings with biotin-resistant 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency. **The Journal of Pediatrics**, 115(1):110-113.

TURNBULL, D.M., BARTLETT, K., STEVENS, D.L., ALBERTI, K.G.M.M., GIBSON, G. J., JOHNSON, M.A., McCULLOCH, A.J. & SHERRATT, H.S.A. 1984. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with lipid-storage myopathy and secondary carnitine deficiency. **The New England Journal of Medicine**, 311(19):1232-1236.

TURNBULL, D.M., BARTLETT, K., WATMOUGH, N.J., SHEPHERO, I.M. & SHERRATT, H.S.A. 1987. Defects of fatty acid oxidation in skeletal muscle. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 10 Suppl. 1:105-112.

VAN DER WERF, M.J., VAN DEN TWEEL, W.J.J. & HARTMANS, S. 1993. Thermodynamics of the maleate and citraconate hydration reactions catalysed by malease from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. **European Journal of Biochemistry**, 217:1011-1017.

VAN ROOYEN, J.P.G. 1994. Urinary excretion of minor metabolites produced by citrate synthase condensation in patients with propionic acidaemia. M.Sc-verhandeling. Potchefstroom: PU vir CHO. p 102.

VEEGER, C., DER VARTANIAN, D.V. & ZEYLERMAKER, W.P. 1969. Succinate dehydrogenase. (In: Lowenstein, J.M. (red.). *Methods in enzymology* Volume XIII. Citric acid cycle. New York: Academic Press. p 81-90).

VIANEY-LIAUD, C., DIVRY, P., GREGERSEN, N. & MATHIEU, M. 1987. The inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 10 Suppl. 1:159-198.

VILARINHO, L., CARDOSO, M.L., RABIER, D. & ROLLAND, M.O. 1993. 3-Hydroxy-3-methylglutaric aciduria in Portuguese population. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 16:154-155.

WANDERS, R.J.A., ZOETERS, P.H.M., SCHUTGENS, R.B.H., DE KLERK, J.B.C., DURAN, M., WADMAN, S.K., VAN SPRANG, F.J., HEMMES, A.M. & VOORBROOD, B.S. 1990. Rapid diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency via enzyme activity measurements in leukocytes or platelets using a simple spectrophotometric method. **Clinica Chimica Acta**, 189:327-334.

WANG, C.C. & BARKER, H.A. 1969. L-Citramalate hydrolase. (In: Lowenstein, J.M. (red.). *Methods in enzymology*. Volume XIII. Citric acid cycle. New York: Academic Press. p 331, 343).

WENDEL, U. 1989. Abnormality of odd-numbered long-chain fatty acids in erythrocyte membrane lipids from patients with disorders of propionate metabolism. **Pediatric Research**, 25(2):147-150.

WENDEL, U., BAUMGARTNER, R., VAN DER MEER, S.B. & SPAAPEN, L.J.M. 1991. Accumulation of odd-numbered long-chain fatty acids in fetuses and neonates with inherited disorders of propionate metabolism. **Pediatric Research**, 29(4):403-405.

WILCKEN, B., CARPENTER, K.H. & HAMMOND, J. 1993. Neonatal symptoms in medium chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. **Archives of Disease in Childhood**, 69:292-294.

WOLF, B., GRIER, R.E., ALLEN, R.J., GOODMAN, S.I. & KIEN, C.L. 1983. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. **Clinica Chimica Acta**, 131:273-281.

WOLF, B., GRIER, R.E., ALLEN, R.J., GOODMAN, S.I., KIEN, C.L., PARKER, W.D., HOWELL, D.M. HURST, D.L. 1983. Phenotypic variation in biotinidase deficiency. **The Journal of Pediatrics**, 103(2):233-237.

WOLF, B. & HEARD, G.S. 1991. Biotinidase deficiency. **Advances in Pediatrics**, 38:1-21.

WOLF, B., HSIA, Y.A., SWEETMAN, L., GRAVEL, R., HARRIS, D.J. & NYHAN, W.L. 1981. Propionic acidemia: a clinical update. **The Journal of Pediatrics**, 99(6):835-846.

WOOD, P.A., AMENDT, B.A., RHEAD, W.J., MILLINGTON, D.S., INOUE, F. & ARMSTRONG, D. 1989. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in mice. **Pediatric Research**, 25(1):38-43.

WYSOCKI, S.J. & HÄHNEL, R. 1986. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: A review. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 9:225-233.

YAMAGUCHI, S., ORII, T., MAEDA, K., OSHIMA, M. & HASHIMOTO, T. 1990. A new variant of glutaric aciduria type II: Deficiency of β -subunit of electron transfer flavoprotein. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, 13:783-786.

YAMAGUCHI, S., ORII, T., SUZUKI, Y., MAEDA, K., OSHIMA, M. & HASHIMOTO, T. 1991. Newly identified forms of electron transfer flavoprotein deficiency in two patients with glutaric aciduria type II. **Pediatric Research**, 29(1):60-63.

YAMAGUCHI, S., SHIMIZU, N., ORII, T., FUKAO, T., SUZUKI, Y., MAEDA, K., HASHIMOTO, T., PREVIS. & RINALDO, P. 1991. Prenatal diagnosis and neonatal monitoring of a fetus with glutaric aciduria type II due to electron transfer flavoprotein (β -subunit) deficiency. **Pediatric Research**, 30(5):439-443.

ZUBAY, G. 1988. Catabolism of amino acids. (In: Zubay, G. (red.). Biochemistry. Tweede uitgawe. New York: MacMillan Publishing Company. London: Collier MacMillan Publishers. p 639-640).

BEDANKINGS

Ek rig my gewaardeerde erkenning aan die volgende persone en instansies:

- * Prof. L.J. Mienie as studieleier, vir sy volgehoue getroue en geduldige leiding.
- * My ouers vir finansiële steun en opoffering deur my studiejare.
- * Die Biblioteek van die Fakulteit Geneeskunde aan die Universiteit van Pretoria vir uitmuntende dienslewering tydens die versameling van die literatuur.
- * Dr. F.A. Müller van die Departement Geneeskundige Fisiologie aan die Universiteit van die Oranje-Vrystaat vir kundige raad en proeflees van die verhandeling.
- * Me. Elsa Brand van Potchefstroom vir die taalkundige versorging.
- * Me. Karin Vergeer vir die trek van figure en die tegniese versorging van die verhandeling.
- * My ouers, familie en vriende vir belangstelling, ondersteuning en aanmoediging.
- * Die Mediese Navorsingsraad vir befondsing van die navorsing.

Bo alles dank en eer aan my Hemelse Vader vir die verstandelike vermoëns en daaglikse krag om hierdie studie uit te voer.