

**T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**İDRAR ORGANİK ASİDLERİNİN
FARKLI YAŞ GRUPLARINDA DAĞILIMI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Rabia Nur KOCABAŞ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Oya BAYINDIR**

İZMİR, 2008

ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Klinik Biyokimya Bilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sevgisini, ilgisini ve emeğini benden esirgemeyen başta tez danışmanım Prof. Dr. Oya Bayındır'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Taner Onat'a, Prof. Dr. Dilek Özmen'e, Prof. Dr. Sara Habif'e, Prof. Dr. Eser Sözmen'e, Prof. Dr. Işıl Mutaft'a, Prof. Dr. Nevbahar Turgan'a, Prof. Dr. Gülinnaz Ercan'a, Prof. Dr. Ferhan Sağın'a ve Prof. Dr. Hakan Aydın'a, Doç. Dr. Yasemin Akçay'a Doç. Dr. Ceyda Kabaroğlu'na, Doç. Dr. Zühal Parıldar'a, Doç. Dr. Handan Ak Çelik'e,

Uzmanlık eğitimimde emeği geçen emekli hocalarım Prof. Dr. Biltan Ersöz'e, Prof. Dr. Fatma Kutay'a, Prof. Dr. Tijen Tanyalçın'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca uyum ve sevgi ile beraber çalıştığımız tüm uzmanlarımıza, asistan ve teknisyen arkadaşlarıma ve Biyokimya Anabilim Dalı'nın tüm üyelerine,

Tüm eğitimim ve çalışma hayatım süresince sevgi ve anlayışla beni destekleyen ve hep yanımda olan aileme

En içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Dr. Rabia Nur KOCABAŞ

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Organik Asidler ve Metabolizmaları	2
2.2. Organik Asid Metabolizması ile İlgili Primer Hastalıklar	5
2.2.1. Dalı Zincirli Organik Asidüri	6
2.2.1.1. Dalı Zincirli 2-Ketoasidüri	6
2.2.1.2. İzovaleik Asidüri	7
2.2.1.3. 3-Metilkrotonik Asidüri	8
2.2.1.4. 3-Metilglutakonik Asidüri	9
2.2.1.5. HMG Asidüri	12
2.2.2. Kısa Zincirli Organik Asidüri	12
2.2.2.1. Propiyonik Asidüri	12
2.2.2.2. Metilmalonik Asidüri	14
2.2.2.3. Glutarik Asidüri	15
2.2.2.4. 2-Hidroksiglutarik Asidüri	16
2.2.2.5. 4-Hidroksibutirik Asidüri	17
2.2.2.6. Malonik Asidüri	17
2.2.2.7. Etilmalonik Asidüri	17
2.2.2.8. Fumarik Asidüri	18
2.2.2.9. Süksinilasetonüri	18
2.2.2.10. Okzalik Asidüri	20
2.2.2.11. N-Asetilaspartik Asidüri	20
2.2.3. Orta-Zincirli Dikarboksilik Asidüri	20
2.2.3.1. Orta-Zincir Açıl-KoA Dehidrogenaz (MCAD)	
Eksikliği	21
2.2.3.2. Uzun-Zincir Açıl-KoA Dehidrogenaz (LCAD)	
Eksikliği	22
2.2.3.3. Kısa-Zincir Açıl-KoA Dehidrogenaz (SCAD)	
Eksikliği	23
2.2.3.4. 3-Hidroksidikarboksilik Asidüri	23
2.2.4. Aromatik Organik Asidüri	25

2.2.4.1. Fenilpiruvik Asidüri (ve Fenillaktik Asidüri)	25
2.2.4.2. Fenilasetik Asidüri	25
2.2.4.3. 4-Hidroksifenilpiruvik Asidüri (ve 4-Hidroksifenillaktik Asidüri)	25
2.2.4.4. Homogentisik Asidüri	26
2.2.4.5. Ksantürenik Asidüri	26
2.2.5. Laktik Asidüri	27
2.2.5.1. Laktat Metabolizmasının Edinsel Bozukluklar	27
2.2.5.2. Laktat Metabolizmasının Kalıtsal Kusurları	28
2.2.5.3. D-Laktik Asidüri	30
2.2.6. Ketonüri	30
2.2.7. 5-Oksoprolinüri	31
2.2.8. Mevalonik Asidüri	31
2.2.9. Havskinsinüri	31
2.3. Sekonder Organik Asidüriler	35
2.3.1. İlaçlar	35
2.3.2. Diet	38
2.3.3. Barsaktaki Bakteriyel Metabolizmanın Katkıları	41
2.3.4. Prematürite	43
2.3.5. Böbrek Yetmezliği	43
2.3.6. Doğum Asfiksisi	44
2.4. Organik Asid Analizi	44
2.4.1. Preanalitik Koşullar	45
2.4.1.1. Örnek	45
2.4.1.2. Hasta durumu	46
2.4.1.3. Örnek toplama	50
2.4.2. Serbest Organik Asidlerin Analizi	51
2.4.2.1. Ayrıştırma (Ekstraksiyon)	51
2.4.2.2. Türevlendirme (Derivatizasyon)	51
2.4.2.3. GC – MS	52
2.4.3. Organik Asidürilerin Araştırılmasında Kullanılan Diğer Tetkikler	52
2.4.4. Organik Asid Analizinin Yorumu	54

2.4.5. Artefaktlar	55
3. ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEMLER	58
3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması	58
3.2. İdrar Örneklerinin Alınması ve Saklanması	58
3.3. Araç-Gereç	58
3.4. Kimsayal Madde Ve Çözeltiler	59
3.5. Yöntem	60
3.6. İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	63
5. TARTIŞMA	68
6. ÖZET	75
7. ABSTRACT	76
8. KAYNAKLAR	77

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Organik asidler, ekzojen bileşikler yanısıra, ara metabolizma yollarının büyük bir bölümünün temel metabolitlerinden oluşmaktadır. Bu nedenle organik asidlerin vücut sıvılarında kapsamlı analizi, çeşitli metabolik yolların fizyolojik ve patofizyolojik durumları ve bunların aralarındaki etkileşim ile ilgili bilgi verme potansiyeline sahiptir (1). Organik asidüriler, normalde idrarda bulunabilen organik asidlerin aşırı derecede atılımı ya da normalde idrarda bulunmayan organik asidlerin varlığı ile karakterize olan hastalıklardır. İdrar içeriğinin gelişmiş kütle spektrometrik yöntemler ile analizi, organik asid atılımı ile karakterize olan çeşitli kalıtsal metabolik hastalıkların tanı ve izlemine olanak sağlamıştır (2,3). Bu hastalıklardan her biri tek tek ele alındığında ender görülmekle birlikte, bir hastalık grubu olarak değerlendirildiğinde klinikte önemli bir yer kaplamaktadırlar. Organik asidürilerde erken tanı ve uygun tedavi yaşamsal bir öneme sahiptir. Ancak, organik asid metabolizmasına ilişkin çeşitli primer hastalıklarda gözlenen anormallikler arasında önemli oranda çakışmaların gözlenmesi, ayrıca hastanın aldığı diyet ve ilaç tedavisinin idrardaki organik asid düzeylerini önemli miktarda etkilemesi, organik asidürilerde yorumu zorlaştırmaktadır. Bazı hastalıklarda tipik tanısal anormalliklerin sürekli olarak değil, sadece hastalığın tetiklendiği dönemlerde ortaya çıkması da yorumu zorlaştıran etkenlerden biridir (2). Organik asidlerin çok kompleks ve çeşitli olması, organik asid analizinde kantitatif yöntemlerin geliştirilmesini güçleştirdiğinden bu yöntemler henüz yaygın olarak kullanılamamaktadır (1).

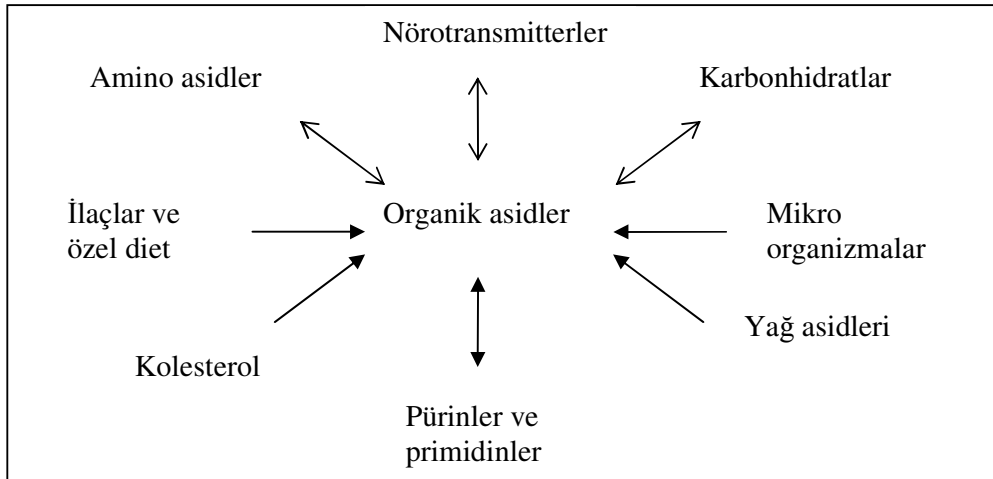
Bu ön bilgilerin ışığı altında bu çalışmada, kalıtsal metabolik hastalık ön tanısı ile hastanemize başvuran ya da tanı alıp izlemi yapılan, değişik yaş gruplarındaki hastalarda ve ayrıca ebeveynlerinde idrar organik asid analizlerinin sağlıklı değerlendirilebilmesi için, yaş gruplarına göre alt ve üst düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı. Yaşları 1-40 arasında değişen toplam 120 olgu, 40'ar kişiden oluşan üç gruba ayrılarak değerlendirildi ve 1-5 yaş, 6-18 yaş ve 19-40 yaş arasındaki olgular için idrardaki organik asidlerin ölçümü yapılarak ve referans değerleri saptandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ORGANİK ASİDLER ve METABOLİZMALARI

Organik asidler, ekzojen bileşikler yanısıra, ara metabolizma yollarının büyük bir bölümünün temel metabolitlerinden oluşmaktadır (Şekil 1). Bir ya da daha fazla karboksilik asid ya da asidik fenolik fonksiyonel grubu içeren, fakat ninhidrinle tepkime verebilecek primer amino grubu içermeyen, suda çözünebilir bileşikler olan organik asidler, karboksilik asid ya da asidik fenolik gruplara ek olarak, hidroksil, okso, amidler, esterler ya da tiyol grupları ve olefinik gruplar gibi yapısal özellikler de taşıyabilirler(2-5). Organik asidler sistematik olarak elde edildikleri alkanlar temel alınarak isimlendirilirler; ancak bir çoğunun daha iyi bilinen ve sık kullanılan isimleri de bulunmaktadır (2).

Katı ve sıvı fazlarda organik asid molekülleri ağırlıklı olarak dimerler halinde bulunurlar. Fizyolojik açıdan önemli organik asidler vücut sıcaklığında sıvı olarak bulunurlar. Zincir uzunluğu ve molekül ağırlığı arttıkça suda çözünebilirlikleri azalır. Sodyum ve potasyum tuzları ise genel olarak çözünmemiş asidlere göre suda daha iyi çözünürler. Organik asidler çözünme sabitleri (K_a) üç ile beş arasında olan zayıf asidlerdir ve fizyolojik pH'ta genellikle tamamına yakını çözünmüştürler. Membran bozucu etkileriyle yüzey gerilimini azaltan anyonik maddeler olarak davranabilen uzun zincirli yağ asidleri (>16 karbon) lipofilik olup biyolojik aktivitelerinin bir kısmı hücre membranları ile bütünleşmiş hale gelebilme yeteneğiyle ilişkilidir (2).



Şekil 1: Küçük molekül ara metabolizmasında organik asidler (1)

Temel olarak, organik asid metabolizmasında yer alan bir enzim eksikliği sonucu ortaya çıkan her kalıtsal hastalık, etkilenen tepkimedeki substratın birikimi ile sonuçlanmaktadır. Kusurlu tepkimenin yerini belirlemede, bu bileşiklerin tanımlanması önemli bir bulgudur. Ancak bu ara ürünün çözünmez yapıda olması ya da mitokondri gibi erişilemeyen hücresel kısımlarda bulunması, saptanabilirliğini zor, hatta imkasız hale getirebilir. Örneğin, kalıtsal yağ asidi metabolizma kusuru ve organik asid metabolizmasının diğer bir çok primer metabolik hastalıkları genellikle lokal açıl-koenzim A (açıl-KoA) moleküllerinin birikimi ile sonuçlanır. Anormal açıl-KoA bileşikleri, hücresel membranları geçememeleri, dokuda miktar tayinlerinin teknik olarak kullanışlı olmaması ve serbet KoA'ları (CoASH) korumaya yönelik olarak KoA'nın karnitin ile hızla metabolik etkileşime girmesi nedeniyle nadiren tanımlanabilmektedir. Ancak, hasarın sekonder metabolik sonuçlarının tanımlanması sıklıkla teknik olarak daha kolay olup, tanısal açıdan önemlidir. Yukardaki örnekte söz edilen, kusurlu enzimin açıl-KoA substratının ester grubunun ayrılması, serbest organik asidin ve karşılık gelen karnitin esterlerinin idrarda birikimiyle sonuçlanmakta olup, bu ürünlerin modern teknikler ile gösterilmesi göreceli olarak daha kolaydır. Daha az metabolize edilen diğer organik asidler ve aromatik asidler ise glisin ya da glukuronik asidle konjuge edilerek idrarla atılıma uğrarlar. Örneğin, lösin metabolizmasıyla ilgili kalıtsal bir kusur olan izovalerik asidemide idrarda biriken izovaleratın büyük bir bölümü izovalerilglisin şeklindedir; bir çok ilaç kökenli organik asid de idrarla glukuronidler olarak atılmaktadır (2).

Dallanmamış uzun zincirli yağ asidleri (>16 karbonlu alifatik monokarboksilik asidler) ağırlıklı olarak, mitokondride beta oksidasyonla asetil KoA'ya metabolize edilir ve ileri aşamada trikarboksilik asid döngüsü üzerinden su ve CO₂'ye okside edilirler. Bu yağ asidleri, bazı fizyolojik durumlar ve birçok patolojik koşulda peroksizomlarda yer alan diğer bir beta oksidasyon sistemi ile de okside edilebilirler. Peroksizomal beta oksidasyon, dört bakımdan mitokondriyal beta oksidasyondan önemli farklılıklar göstermektedir; yağ açıl-KoA dehidrogenazlar için elektron alıcısı elektronları ATP oluşumu olmaksızın suya transfer eden bir flavoprotein olup, oksidasyon H₂O₂ üretimi ile sonuçlanır, enol KoA hidrasyonu ve 3-hidroksiaçıl-KoA dehidrojenasyonu tek bir enzim tarafından katalizlenen, planlanmış bir tepkime ile gerçekleşir ve hidrokarbon oksidasyonu 8 karbon zincir uzunluğundan ileri gidemez. Peroksizomal beta oksidasyondan köken alan, ya da diyet kökenli olan orta zincirli yağ asidleri (8-12 karbon) mitokondride beta oksidasyon ya da mikrozomal omega oksidasyon ile okside edilirler. Fitnik asid gibi, klorofil metabolizmasından sağlanan dallı zincirli yağ asidleri, mikrozomal bir enzim sisteminde alfa oksidasyon ile okside edilirler.

Diyabetes mellitus veya uzun süreli açlık durumlarında olduğu gibi, enerji üretimi için yağ asidi oksidasyonundaki artış veya rol alan enzimlerden birindeki yetersizliğe bağlı olarak mitokondriyal beta oksidasyon kapasitesi aşıldığında, peroksizomal ve mikrozomal oksidasyon artmakta, ve bu durum idrarda orta zincirli dikarboksilik asitlerin birikimine yol açmaktadır (2).

Bir kısım organik asidopatilerde, açıl-karnitinlerin birikimi ve atılımı, yağ asidi metabolizması üzerine sekonder etkilerle, karnitin yetmezliğine yol açmaktadır. Karnitinin önemli metabolik işlevlerinden biri, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye transferini kolaylaştırmak olup, bu işlem karnitin palmitoiltransferaz I (CPT I) tarafından katalizlenen bir tepkime ile, yağ açıl-KoA'nın karnitin ile transesterifikasyonunu, iç mitokondrial membran boyunca yer değiştirmeyi ve CPT II'nin katalizlediği bir tepkime ile yeniden yağ açıl KoA oluşumunu kapsamaktadır (6,7). Organik asidüriyi de kapsayan sekonder karnitin yetmezliğine bağlı metabolik sonuçların, primer karnitin yetmezliği ve primer yağ asidi oksidasyonu kusurlarından ayırt edilmesi zordur.

Amino asid metabolizması ile ilgili kalıtsal kusurların bir çoğu, amino asid katabolizmasındaki ilk basamak olan transaminasyondan sonraki tepkimeleri kapsamakta olup, birtakım türetilmiş organik asitlerin birikimi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle amino asidopatilerin birçoğu organik asidüri ile birlikte seyrederek. Akçaağaç şurubu hastalığı gibi ilişkili amino asidin çok fazla birikim gösterdiği durumlar, sıklıkla organik asidüriden ziyade amino asidopati olarak sınıflandırılmaktadırlar (2).

Metabolik asidoz, organik asid metabolizması ile ilgili kalıtsal kusurların bir bölümünde önemli bir göstergedir (metil malonik asidemi gibi) ve hastalığın kliniğinde düşük molekül ağırlıklı anyonların birikimine atfedilebilen taşipne, baskın bir bulgudur. Üç ya da daha çok karbon içeren birçok alifatik açıl bileşiği; düşük molekül ağırlıklı anyonlar olarak oluşan metabolik etkilerinden bağımsız bir etki gibi görünen ensefalopatik özellikler taşırlar (8). En sık görülen yağ asidi oksidasyon kusurlarından biri olan orta zincirli açıl-KoA dehidrogenaz (MCAD) eksikliğinde biriken oktaonatın, KoA metabolizmasını inhibe ettiği ve hücresel membranlarda çözünbilme yeteneğine bağlı olarak anesteziye yol açtığı gösterilmiştir (9).

Organik asid metabolizması ile ilgili primer hastalıklarda, hastalardaki semptomların önemli bir nedeni sekonder metabolik etkilerdir. Bir örnekleme yapılacak olursa, anormal açıl-KoA

birikimi birçok organik asidopatinin özelliği olup, uzun vadeli sonuçlar doğurabilir. Bu sonuçlar, mitokondriyal oksidatif metabolizmada çeşitli enzimlerinin inhibisyonu, ATP, NADH ve diğer yüksek enerjili bileşiklerin yetersiz üretimini kapsar ve hücre içinde azalmış serbest KoA düzeyleri ile birlikte seyreder. Mitokondride serbest KoA'nın ve esterifiye KoA'ya oranı, piruvat dehidrogenaz (PDH) ve 2-okzoglutarat dehidrogenaz aktivitelerinin düzenlenmesinde önemlidir. Serbest KoA varlığının azalması ve takiben asetil-KoA'nın tüketilmesi, piruvat dehidrogenazın allosterik olarak uyarılamamasına bağlı olarak glikoneogenezde azalma, karbamoil fosfat sentaz I'in (CPS I) temel allosterik aktivatörü olan N-asetil glutamat sentezinin azalmasına bağlı amonyak detoksifikasyonunun bozulması gibi geniş etkilere neden olmaktadır. Organik asid metabolizması ile ilgili primer veya sekonder kusurun söz konusu olduğu bir çok hastada, hipoglisemi ve yaşamı tehdit eden amonyak yüksekliği önde gelen klinik problemlerdir. MCAD eksikliği olan hastalarda biriken temel metabolitlerden biri olan oktaonat verilen hayvanlarda, mitokondrial enerji metabolizması üzerine direk etkiler de gösterilmiştir (9-11).

2.2. ORGANİK ASİD METABOLİZMASI İLE İLGİLİ PRİMER HASTALIKLAR

Bir hastalığın kalıtsal bir organik asid metabolizma kusuruna bağlı olabileceğinin farkına varılması, kesin tanı ve hastalığın tedavisinde en kritik basamağı oluşturmaktadır. Bu durum organik asidopatiyi akla getirecek klinik bulguların bulunmadığı veya silik olduğu durumlarda yapılan bir organik asid taramasında, idrarda beklenmedik bileşiklerin saptanması ile gerçekleşebilir. Ancak daha sık olarak, hastanın klinik durumu klinisyeni uyarır (12). Çeşitli organik asidopatilerin klinik bulguları, ilişkili oldukları metabolik yollara, biriken metabolitin doğasına, kusurun sekonder metabolik etkilerine ve kusurun kısmi ya da tam olup olmamasına bağlı olarak belirgin farklılıklar göstermektedir. Bazı klinik durumlar organik asidopatiler arasında yaygın olarak görülmekte olup, klinisyeni bu olasılık hakkında uyarmalıdır. Bu bulgular; akut metabolik asidoz, akut ya da aralıklarla gelişen ensefalopati, kronik ensefalopati, miyopati (kardiyomiyopati de dahil) ve büyüme geriliğidir (2,13). Birçok olguda semptomlar bir arada görülebilir (kronik ensefalopati zemininde akut metabolik asidoz, kronik ensefalopati ve gelişme geriliği, dirençli metabolik asidoz ve kronik ensefalopati ile beraber gelişme geriliği gibi). Bununla beraber aynı metabolik kusur, aynı ailenin bireyi olsalar bile farklı hastalarda, kusurun şiddetine, hasta yaşına ve her hastada

bireysel değişikliklere katkıda bulunan gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerinin katkısına bağlı olarak farklı bulgular ile ortaya çıkabilmektedir. Organik asid metabolizması ile ilgili primer hastalıkların her biri, idrarda organik asid anormallikleri ile ilişkilidir (Tablo 2 ve 3). Ancak bazı vakalarda, özellikle yağ asidi oksidasyon kusurlarında görülen anormallikler, aralıklarla ortaya çıktığından ya da dikkat çekecek düzeylerde olmayadığından bu durum tanıda gecikmeye yol açabilir. Genellikle akut metabolik dekompanzasyon döneminde toplanan idrar örneği idrarda organik asid analizi için en güvenilir örneği oluşturmaktadır. Alternatif olarak, organik asidürinin aralıklarla ortaya çıktığı durumlarda bir anormalliğin varlığı, kontrollü açlık ya da metabolik ara ürünlerin yüklemesi gibi dikkatle kontrol edilmiş provakatif testler aracılığı ile gösterilebilmektedir (2).

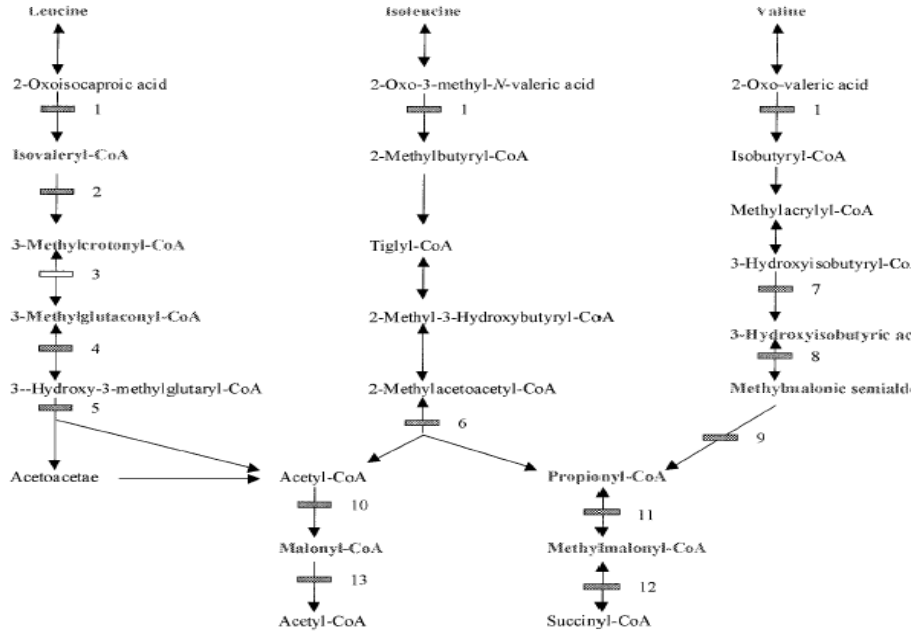
2.2.1. Dalı Zincirli Organik Asidüri

Valin-lösin-izolösin dalı zincirli amino asidlerinin metabolizmasındaki primer genetik kusurların birçoğunda dalı zincirli organik asidüri belirgin bir özelliktir (Şekil 2).

2.2.1.1. Dalı Zincirli 2-Ketoasidüri

Dalı zincirli 2-ketoaçıl-KoA dehidrogenaz enzim eksikliğinden kaynaklanan akçaağaç şurubu hastalığında 2-oksokaproik, 2-okso-3-metilvalerik ve 2-oksoizovalerik asitler büyük miktarlarda atılır (2). Söz konusu enzim α ve β alt ünitelerinden oluşan dalı zincir 2-ketoasid dekarboksilazı (*E1*), bir dihidrolipottransferazı (*E2*), bir dihidrolipoil dehidrogenazı (*E3*) içeren mitokondriyal multienzim kompleksidir (14). Hastalık klinik olarak, yeni doğan döneminde şiddetli ketoasidozla birlikte seyreden akut ensefalopati (beslenme yetersizliği, kusma, nöbet, uykuya meyil, stupor ve koma) ile ortaya çıkar. Ancak hastalığın, araya karışan başka bir hastalığın tetiklediği intermittan ketoasidoz epizodları dışında sağlıklı görünümlü çocuklar ya da ketoasidoz yokluğunda ılımlı ve ya şiddetli zeka geriliği ile karakterize varyantları da bulunmaktadır. Plazma amino asidlerinin analizinde, dalı zincirli üç amino asitte belirgin bir artışla beraber, 2-okso-3-metilin transaminasyon ve keto-enol tautomerizasyon ürünü olan alloizolösin birikimi de görülür. Etkilenen hastaların idrarında 2-ketoasidlerin güvenilir şekilde tanımlanabilmesi için, hidroksilamin ile türevlendirme ve organik asidlerin oksimler olarak analizi gerekebilir. 2-Ketoasidlere ek olarak, idrarda 2-keto gruplarının in vivo olarak enzimatik indirgenmesinden oluşan, dalı zincire uygun büyük

miktarlarda 2-hidroksi asitler de bulunur. Dallı zincirli 2-hidroksi asitler GC-MS ile saptanabilirler ve tanıyı kolaylaştırmak için yeterince karakteristiktirler (2,14).



Şekil 2 : Dallı zincirli amino asit katabolizmasındaki yollar (2)

1: Dallı zincirli okso-(veya keto-) asit dehidrogenaz; 2: izovaleril-koenzim A (KoA) dehidrogenaz; 3: 3-metilkrotonoil-KoA karboksilaz; 4: 3-metilglutakonil-KoA hidrataz; 5: 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA liyaz; 6: 2-metilasetoasetil-KoA tiyolaz; 7: 3-hidroksiizobütiril-KoA deaçilaz; 8: 3-hidroksiizobütirik dehidrogenaz; 9: metilmalonilsemialdehid dehidrogenaz; 10: asetil-KoA karboksilaz (mitokondride), 11: propionil KoA karboksilaz; 12: metil-KoA mutaz; 13: malonil-KoA dekarboksilaz. Enzim kusurları kesiksiz çizgilerle gösterilmiştir.

2.2.1.2. İzovalerik Asidüri

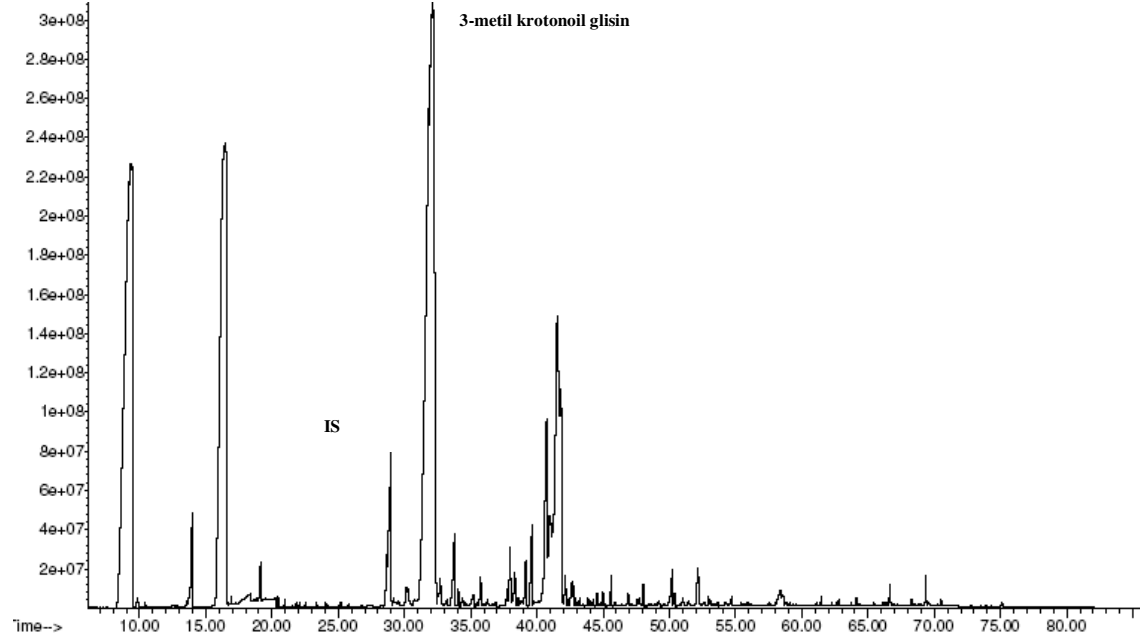
İzovalerik asit, lösin amino asidinin metabolizmasında, 2-oksoizokaproik asidin oksidatif dekarboksilasyonundan oluşur. Primer izovaleril-KoA dehidrogenaz eksikliği olan hastaların idrarında büyük miktarlarda izovalerik asit atılır (3,14,15). Hastalık sıklıkla yeni doğan döneminde, ketoasidoz ve amonyak yüksekliğinin eşlik ettiği akut ensefalopati ile ortaya çıkar. Diğer primer organik asidopatilerde olduğu gibi, iyi görünen sağlıklı durumun aralıklı olarak metabolik asidoz, hiperamonyemi ve ensefalopati ile seyreden metabolik dekompanzasyon epizodları ile kesintiye uğradığı, geç başlangıçlı varyantlar da söz konusudur. Düşük proteinli diyet,, glisin ve karnitin desteği ile prognoz iyi seyreder ancak akut epizodlar yaşamı tehdit edici olabilir (3).

Etkilenen hastaların idrarı, metabolik dekompanzasyon döneminde bile çok düşük miktarlarda serbest izovalerat içerir. İdrarda birikmiş izovalerat, izovalerat ve glisin in vivo kondensasyonundan elde edilen izovalerilglisin olarak idrarla atılıma uğrar. Akut metabolik dekompanzasyon dönemlerinde etkilenen hastaların idrarları, yüksek laktat, asetoasetat ve 3-hidroksibütirat düzeylerine ek olarak 3-hidroksiizovalerat ta içerir (2,3,14). Plazmada, sırasıyla lösin ve izolösin yıkımından elde edilen izovalerilglisin ve 2-metilbütirikarnitin karışımı olan C5 açılkaritin düzeylerinde artış saptanır (3). İzovalerik asidüri, mitokondrial flavoprotein bağımlı açıl-KoA dehidrogenaz eksikliğinde ortaya çıkan Glutarik asidüri Tip II' de de görülebilir (2,16). Ancak bu hastalıkta yüksek düzeylerde glutarik asid yanısıra diğer organik asidlerin de varlığı, primer izovalerik asidüriden ayırımı sağlar (2).

2.2.1.3. 3-Metilkrotonik Asidüri

3-Metilkrotonik asid, lösin metabolizmasında, izovaleril-KoA'nın enzimatik dehidrogenasyonundan köken alan bir ara üründür. Birikim, biotin bağımlı dört karboksilazdan biri olan 3-metilkrotonil-KoA karboksilaz enziminin eksikliğine bağlı olarak gerçekleşir (17). Bu enzimin izole spesifik eksikliği, ender görülen bir durum olup, klinik olarak şiddetli ketoasidozla beraber seyreden hipoglisemi epizodları ile karakterizedir (18). İdrar organik asid analizinde, 3-metilkrotonik asidüriye ek olarak, 3-hidroksiizovalerat ve 3-metilkrotonilglisin varlığı da gözlenir. 3-metilkrotonik asid, biotine bağımlı dört karboksilazın eksiklikleri ile karakterize olan kalıtsal biotin metabolizması kusuru olan hastaların idrarında bulunan çeşitli organik asidlerden biridir. Çoklu karboksilaz eksikliği, holokarboksilaz sentaz ya da biotinidaz eksikliklerinin bir sonucu olarak iki şekilde ortaya çıkar. İlk enzim, dört karboksilazın apoenzimlerinin biotinilasyonunu katalizler, ikincisi ise enzim proteinin normal turnoveri esnasında zıt bir tepkime olarak, apoenzimden biotin hidrolizini katalizler (2). Holokarboksilaz sentaz eksikliği, sıklıkla erken bebeklik döneminde, şiddetli metabolik ketoasidoz ve hiperamonyemi ile kendini gösterir (14,19). Biotinidaz eksikliği ise nörolojik belirtiler (nöbet, hipotoni, gelişme geriliği, sensorinöral işitme kaybı, optik atrofi), deri döküntüleri, saç dökülmesi ile karakterize olup, metabolik asidoz, hiperamonyemi biraz daha geç bebeklik ya da çocukluk döneminde ortaya çıkar (16). Çoklu karboksilaz eksikliğinin her iki formunda da prenatal dönemde ya da hastalığın çok erken döneminde yüksek dozda biotin ile yapılan tedavi, iyi bir klinik ve biyokimyasal yanıtı yol açarken, tedavinin erken dönemde başlatılmaması sıklıkla ölümcül sonuçlara yol açar (2).

Çoklu karboksilaz eksikliğinde organik asidüri paterni, spesifik karboksilaz eksikliklerinin herbirinde rastlanan paternlerin bir arada bulunması gibidir: 3-metilkrotonat, 3-metilkrotonilglisin (Şekil 3), 3-hidroksiizovalerat (3-metilkrotonoil-KoA karboksilaz eksikliğine bağlı), laktat, asetoaseat ve 3-hidroksibütirat (piruvat karboksilaz eksikliğine bağlı) ve propiyonat, 3-hidroksi propiyonat, metilsitrat, tiglilglisin (propiyonil-KoA karboksilaz eksikliğine bağlı) idrarda görülebilen organik asitlerdir (2,14).



Şekil 3: 3-metil krotonoilglisin atılımı olan bir olguda idrar organik asitleri (EÜTF Klinik Biyokimya B.D. Arşivi)

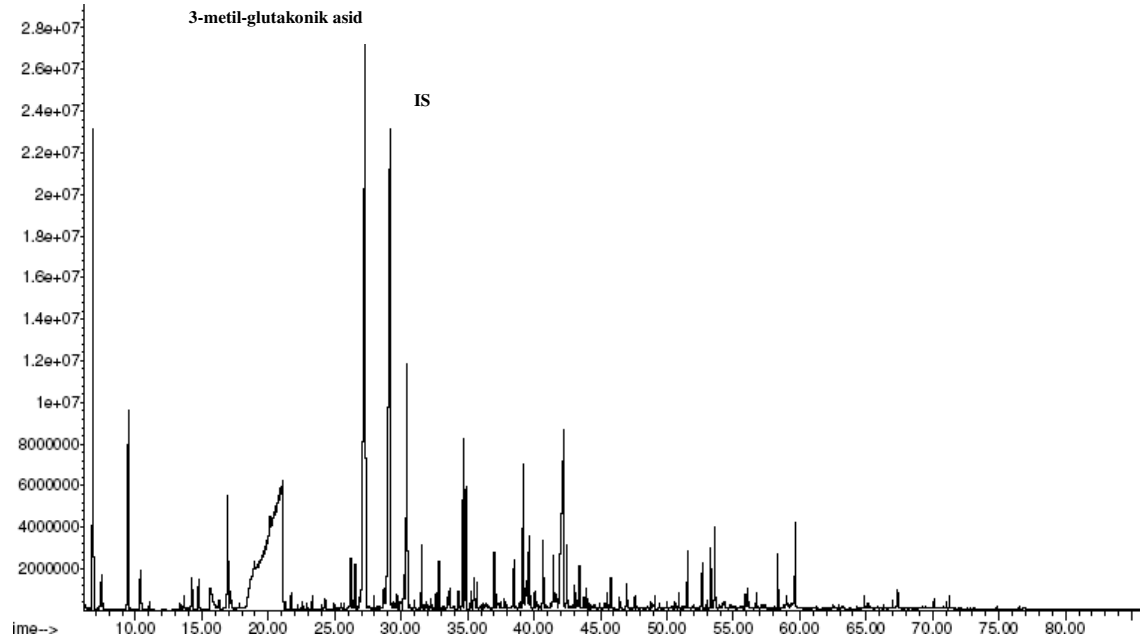
2.2.1.4. 3-Metilglutakonik Asidüri

3-metil glutakonik asidüri (Şekil 4), sıklıkla düşük miktarlarda 3-metilglutarik asid atılımı ile birlikte olup, en az dört adet farklı ve görünüşte birbirinden bağımsız olan kalıtsal metabolik hastalıkta ortaya çıkar (20).

2.2.1.4.1. Tip I

3-Metilglutakonik asid, lösin metabolizmasında bir ara üründür ve 3-metilkrotonoil-KoA'nın enzimatik karboksilasyonundan oluşur. 3-metilglutakonik asidürisi olan hastaların birçoğunda, hidrataz aktivitesi normal bulunmuştur. Ancak tip I 3-metilglutakonik asidüri

olarak tanımlanan az sayıda hastada, kalıtsal 3-metilglutakonil-KoA dehidratazın kalıtsal eksikliğine bağlı olarak oluşan bileşiklerin birikimi ve atılımı gösterilmiştir (21). Hastalık klinik olarak, ılımlı gelişme geriliği, ketaoasidozla ilişkili açlık hipoglisemisi ile seyreder. 3-Metilglutakonik aside ek olarak idrarda düşük miktarlarda 3-hidroksiizovalerat ve 3-metilglutarat ta bulunur. Bu durumdaki hastalarda, lösin yüklemesi sonrasında, her üç metabolitin de düzeylerinde artış görülür.



Şekil 4: 3- metil-glutakonik asidürüli bir olguda idrar organik asidleri (EÜTF Klinik Biyokimya B.D. Arşivi)

2.2.1.4.2. Tip II

3-Metilglutakonik asid X'e bağlı resesif bir hastalık olan ve kardiyomiyopati ve dirençli nötropeni ile karakterize olan Barth Sendromlu hastaların bir bölümünün idrarında, düşük miktarlarda bulunur. 3-metilglutakonik asid ve 3-metilglutarik aside ek olarak idrarda, 2-etilhidrakrilik asid te bulunur. Organik asidürinin mekanizması bilinmemektedir. Tip II 3-metilglutakonik asidüri olarak sınıflandırılan bu hastalarda, 3-metilglutakonil-KoA hidrataz aktivitesi normaldir. Lösin yüklemesi ile 3-metilglutakonik asid atılımının artmaması, kusurun diğer bazı metabolik yollara bağlı olduğunu göstermektedir (2).

2.2.1.4.3. Tip III

3-Metilglutakonik asidüri, erken bebeklikte başlayan, optik atrofi, şiddetli mental retardasyon, koreateto, spatiste ve nöbetlerle karakterize olan Costeff optik atrofi sendromunun da bir özelliğidir (20,22,23). Bu hastalarda 3-metilglutakonil-KoA hidrataz aktivitesinin normal olduğu gösterilmiş olup, organik asidürinin mekanizması bilinmemektedir.

2.2.1.4.4. Tip IV

3-Metilglutakonik asidürinin bu tipi, klinik olarak, hipertrofik kardiyomiyopati, hepatosellüler işlev bozukluğu, mental retardasyon, gelişme geriliği, optik atrofi, nöbetleri içeren şiddetli çoklu organ tutulumu ve inguinal herniler, inmemiş testis, subaortik stenoz ve serebellar hipoplaziyi içeren çoklu kongenital malformasyonlar ile karakterizedir (24). Geçmiş yıllarda, 3-metilglutakonik asidürinin tümünde 3-metilglutakonil-KoA dehidrataz aktivitesinin normal olduğu, bir çok benzer ve daha önce sınıflandırılmamış klinik tipleri bildirilmiştir. Birçok olguda 3-metilglutakonik asid ve 3-metilglutarik aside ek olarak idrarda, laktik asid ve TCA döngüsü ara ürünleri de artmış miktarlarda bulunur. Organik asidürinin patofizyolojisi henüz tam olarak bilinmemektedir; kolesterol biyosentezinde bir kusur olduğu kabul edilmektedir, ancak kolesterol metabolizmasının direk analizinin sonuçları normal bulunmuştur (25).

Mitokondrial enerji metabolizmasında çeşitli kusurlar gösterilmiş olan, benzer klinik özelliklere sahip ve 3-metil glutakonik asidürisi olan, bazı hastalar da bildirilmiştir. Holme ve ark. (26), 3-metilglutakonik asidürisi olan bir çocukta mitokondrial ATP-sentaz (kompleks V) eksikliğini tanımlamışlardır. Ibel ve ark. (27) ve Muller-Hocker ve ark. (28) hastalarında mitokondrial elektron transport komplekslerinin kombine eksikliklerini göstermişlerdir. Lichter-Konecki ve ark. (29), benzer idrar organik asid anormalliklerini, Pearson Sendromlu bir hastada bildirmişlerdir, bu sendrom pankreas yetmezliği, sideroblastik anemi, hepatosellüler işlev bozukluğu, laktik asidoz, kardiyomiyopati ve mental retardasyon ile karakterize bir mitokondrial yetmezlik sendromudur.

Tip IV 3-metilglutakonik asidüri olarak sınıflandırılmış olan hastalık heterojen bir hastalık grubu olup, organik asidüri muhtemelen sekonder ve göreceli olarak spesifik olmayan bir durumdur. Tip I hariç hepsinde, 3-metilglutakonil-KoA dehidrataz aktivitesinin in vitro

ölçümünün, birbiriyle uyumlu olarak normal olduğu bildirilmiştir. 3-Metilglutakonik asidüri, karbamoil fosfat sentetaz eksikliği, uzun zincir 3-hidroksiaçil-KoA (LCHAD) dehidrogenaz eksikliği, renal Fankoni sendromu (25) ve 3-hidroksi-3-metilglutaril-KoA (HMG-KoA) liyaz eksikliği (30) gibi iyi tanımlanmış metabolik hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları olan hastalarda da nonspesifik, sekonder metabolik bir durum olarak saptanabilmektedir. Tüm bu örnekler de dikkate alındığında, 3-metilglutakonik asidürinin yorumunun güç olduğu ve ayrıntılı klinik bilgi olmadan bir yorum yapılamayacağı açıktır.

2.2.1.5. HMG Asidüri

HMG-KoA, normal ketogenez ve kolesterol biyosentezinde bir ara ürün olduğu gibi, lösin metabolizmasında da bir ara üründür. HMG-KoA, ketogenez esnasında, bir karaciğer enzimi olan HMG-KoA sentazın katalizlediği, bir tepkime ile, asetoasetil-KoA'nın, asetil-KoA ile kondensasyonu sonucunda oluşmaktadır. Lösin metabolizmasından köken alan HMG-KoA, 3-metilglutakonil-KoA'nın hidrasyonu ile oluşur. Her iki yoldan da elde edilen HMG-KoA, HMG-KoA liyaz tarafından katalizlenen sitozolik bir tepkime ile asetoasetat ve asetil-KoA'ya hidroliz olur. Primer HMG-KoA liyaz eksikliği, aralıklı kusma dönemleri, hipotoni, hepatomegali komaya giden stupor ile beraber seyreden hipoglisemi, metabolik asidoz, transaminazlarda yükseklik ve bazen yüksek amonyak düzeyleri ile karakterizedir (14,31,32). İdrarda yüksek miktarlarda HMG yanısıra, 3-metilglutakonat , 3-hidroksiizovalerat, 3-metilglutarat atılımı da mevcuttur (14,33). Bu üç metabolitin varlığı, HMG birikimde temel kaynağın lösin olduğunu düşündürür. İdrarda karnitin esterlerinin analizi, 3-metilglutarilkarnitin varlığını gösterir ve hastalığın diğer bir özelliği olan karnitin yetmezliğinden de sorumlu olabilir (34).

2.2.2. Kısa Zincirli Organik Asidüri

2.2.2.1. Propiyonik Asidüri

Propiyonik asid, kolesterol, tek karbon zincirli yağ asitleri, valin, izolösin, metiyonin, treonin amino asitlerinin ve primidinlerin (urasil ve timin) metabolizmasından köken alır (2,3). Normal şartlar altında propiyonil-KoA, biyotin bağımlı karboksilaz ile metilmalonil KoA'ya,

sonra da adenzilkobalamin bağımlı bir mutazla, TCA döngüsünde oksidasyona yol açan süksinil-KoA'ya dönüştürülür. Bu iki enzimin primer ya da sekonder kusurları, ilk tanımlanan organik asidüriler arasındadır (3).

Biyotin bağımlı bir enzim olan propiyonil-KoA karboksilaz (PCC) eksikliğine bağlı olarak, idrarda propiyonik asid ve propiyonil karnitinin birikimi olmaktadır. (14,15). Propiyonik asidemili hastalarda enzimin her iki zincirini de kodlayan genlerde birçok mutasyon tanımlanmıştır (35). Klinik olarak izole PCC eksikliği (propiyonik asidemi) klasik olarak yeni doğan döneminde metabolik asidoz, hiperamonyemi, nötropeni, trombositopeni, hipoglisemi, hipotermi, hipotoni, letarji, apne, hızlı başlangıçlı koma ile kendini gösterir (2,3). Miyeloid progenitörlerinin büyümesinin inhibisyonuna bağlı nötropeni, çoğu vakadaki primer immun yetmezliğe atfedilir (3). Olgularda biriken propiyonil-KoA'nın, CPS'ın allosterik aktivatörü olan N-asetil glutamatın sentezini inhibe etmesine sekonder olarak, üre döngüsü defektlerindeki benzer şekilde yüksek amonyak düzeyleri de görülebilir (36). Hiperamonyemi ve hematolojik anormallikler olmaksızın, ketoasidoz ve ensefalopati ile seyreden geç başlangıçlı varyantlar da tanımlanmıştır. Az sayıda hastada ise, kronik gelişme ya da büyüme geriliği zemininde, ılımlıdan şiddetliye kadar tekrarlayan ketoasidoz dönemleri ile subakut olarak seyreder. Massoud ve Leonard (37), metabolik kardiyomiyopati sonucu akut kardiyak yetmezlik gelişen propiyonik asidemili hastaları da kapsayan bir grup organik asidopatili hasta bildirmişlerdir. Bu hastalarda miyokardiyal tutulumun patogenezi bilinmemektedir.

Apoenzim mutasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan PCC eksikliği, propiyonik asid ve propiyonilkarnitine ek olarak, idrarda büyük miktarlarda 3-hidroksibütirat, asetoasetat, ve düşük miktarlarda metilsitrat, propiyonilglisin, tiglilglisin, 3-hidroksipropiyonat atılımı ile birlikte (2,14). İdrarda metilmalonik asid bulunmaksızın, propionat, 3-hidroksipropiyonat, propiyonilglisin, tiglilglisin ve metilsitrat bulunması hastalık için çok karakteristiktir (14). İdrar organik asidlerinin GC-MS ile analizi esnasında, örnek hazırlığı sırasında propiyonik asidin büyük bir bölümü kayba uğrayabilir veya solvent pikinde elue olması nedeni ile gözden kaçabilir. Bu durumda idrarda metilsitrat, 3-hidroksipropiyonat ve/veya propiyonilglisin varlığı, mutlaka propiyonat metabolizması ile ilgili bir hastalığı düşündürmeli ve buna yönelik ek çalışmalar yapılmalıdır. İdrar ve plazma açilkarnitinlerinin analizinde propiyonilkarnitin varlığının saptanması da, PCC eksikliği için tanısal değer taşımaktadır. Propiyonik asidüri, çoklu karboksilaz eksikliği olan hastalarda da ortaya çıkabilir, ancak, 3-

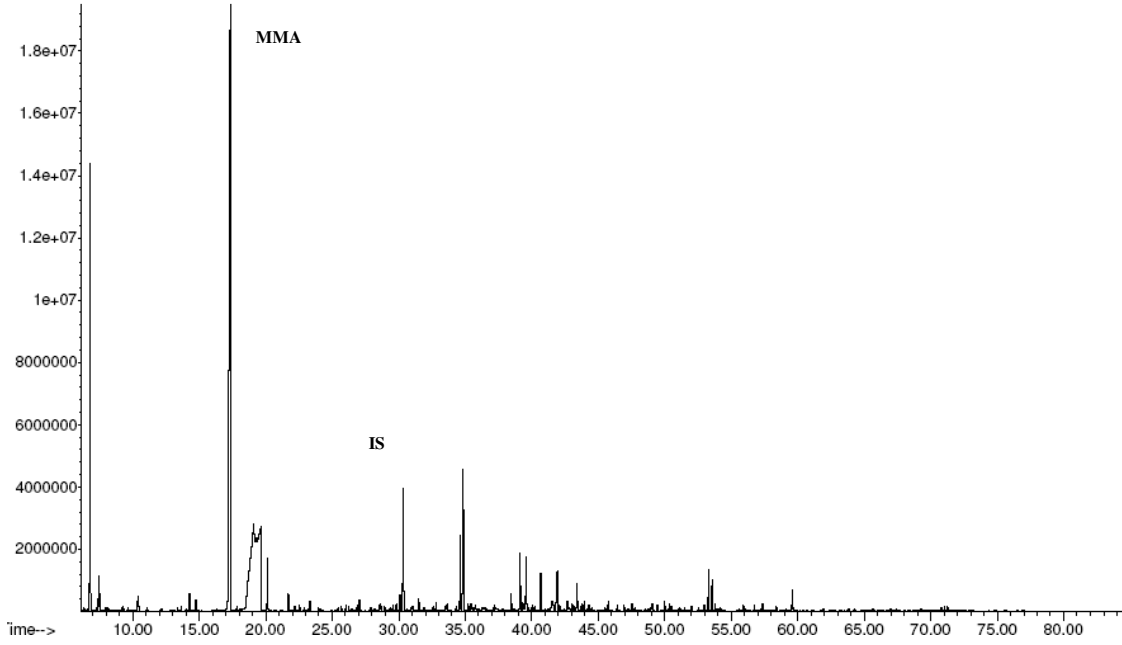
metilkrotonoat ve 3-hidroksiizovalerat gibi organik asidlerin varlığı genellikle hastalıkların açık bir şekilde ayrılabilmesini sağlar (2,3).

2.2.2.2. Metilmalonik Asidüri

Metilmalonik asid, propiyonil-KoA'nın enzimik karboksilasyonundan köken alır. Metilmalonik asidüri kobalamin bağlı bir enzim olan metilmalonil-KoA mutaz eksikliğinin sonucu olarak görülür. Bu eksiklik enzimdeki mutasyonlara veya kobalamin metabolizmasındaki genetik kusurlara sekonder olarak ortaya çıkabilir (2,15,38). Aynı zamanda, besinsel vitamin B12 eksikliğinin de önemli bir biyokimyasal göstergesidir. Yüksek dozda vitamin B12 ile tedaviye cevabın dışında, primer metilmalonil-KoA mutaz eksikliği (mut⁰ ve mut⁻ varyantları), kobalaminin adenozilasyonunda kusurla karakterize olan kobalamin varyantlarından (cb1A ve cb1B) klinik olarak ayırt edilemez. Hastalık sıklıkla yeni doğan döneminde şiddetli ketoasidoz, hiperamonyemi ve akut ensefalopati ile kendini gösterir ve PCC eksikliğine bağlı propiyonik asidemi ve izovaleril-KoA dehidrogenaz eksikliğine bağlı izovalerik asidemiden ayırt edilemez (15). Ancak, mutaz mutasyonlarına bağlı gelişen metilmalonik asideminin klinik görünümü çok çeşitli olabilir ve hatta bazı benign ve asemptomatik varyantlar, organik asid analizi sırasında rastlantısal olarak saptanabilir (38,39).

İdrar organik asid analizinde büyük miktarlarda metilmalonik asid (Şekil 5), 3-hidroksibütirat ve asetoasetat ve okzaloasetat, ayrıca propiyonatın mitokondri içi kondensasyonundan oluşan metilsitrata ek olarak, daha düşük miktarlarda propiyonat ve 3-hidroksipropiyonat varlığı saptanır. Plazma amino asidlerinin analizinde, glisin birikimi saptanır (40). Diğer kobalamin kusurlarına (cb1C, cb1D, cb1E, cb1F, cb1G) bağlı metilmalonik asidüri, hematolojik anormallikler ve homosistinüri ile birlikte seyreder (38,41).

Ancak, idrar organik asid anormallikleri, primer mutaz eksikliği olan hastalarda görülenlerle aynıdır. Benzer şekilde, yetersiz alım ya da absorpsiyon bozukluğuna bağlı besinsel vitamin B12 eksikliğinde de idrar organik asid anormallikleri, daha ılımlı olmakla beraber aynıdır (2,15).



Şekil 5: Metilmalonik asidürlü bir olguda idrar organik asitleri (EÜTF Klinik Biyokimya B.D. Arşivi)

2.2.2.3. *Glutarik Asidüri*

Dallanmamış, beş karbonlu bir dikarboksilik asid, glutarik asid, lösin, lizin ve triptofan metabolizmasının bir ürünüdür. Diğer idrar organik asid anormallikleri bulunmaksızın, fazla miktarda glutarik asid atılımı, glutarik asidüri tip I (GA I) için karakteristiktir. Bu, mitokondrial glutaril-KoA dehidrogenaz eksikliğine bağlı olarak gelişen, nadir görülen bir hastalıktır (2,3). Etkilenen hastalar, engellenebilir nörolojik sonuçlar ve biyokimyasal görünümde önceden tahmin edilemeyecek çeşitlilikle kendini gösterir (3). Klinik olarak hastalık, yavaş progresyon gösteren bir gelişme geriliği, opistotonus, distoni ve yaşamın ilk birkaç ayında başlayan atetoid postür, bazen doğumda var olan makrosefali ve frontal çıkıntı, sıklıkla 3 yaş öncesi başlayan ensefalopatik epizodlar ile karakterizedir (3,42,43). Beyin görüntülemelerinde frontotemporal atrofi, kriz sonrası sekeli olarak striatal dejenerasyon ve bazal ganglionlar ve kaudatta büzüşmeler görülür. Hipotoni, anormal hareketler, nöbetler, hipoglisemi, hepatomegali akut olaylarla ilişkilendirilmiştir (3).

Glutarik asid ayrıca, çoklu açıl-KoA dehidrogenaz (MAD) eksikliği olarak da bilinen, glutarik asidüri tip II'li bebek ve çocukların idrarlarında belirgin miktarda bulunur. Bu durum, mitokondrial elektron transport flavoprotein (ETF) ya da ETF dehidrogenaz (ETF-DH)

eksikliğinden kaynaklanır (44,45). ETF ve ETF-DH, yağ asitleri ve çeşitli amino asitlerin mitokondrial oksidasyonu için temeldir. Hastalık klinik olarak, hastalar arasında belirgin farklılıklar gösterir. En şiddetli formunda, etkilenen bebekler yeni doğan döneminde, karakteristik kongenital malformasyonlar (fasiyal dismorfizm, kalçaya birleşik ayak, karın duvarında müsküler defektler, cinsel organ anormallikleri, böbrek ve beyinde kistik dejenerasyon), şiddetli nörolojik bozukluk, hepatomegali, hipoglisemi ve metabolik asidoz gibi özellikler gösterir. Diğer hastalar, hastalığın en şiddetli tipiyle ilgili kongenital malformasyonlar olmaksızın, erken bebeklik döneminde metabolik anormallikler gösterirler. En hafif formda ise, hastalık geç bebeklik ve ya çocukluk döneminde inatçı kusma epizodları, stupor, hepatomegali, miyopati, hepatosellüler işlev bozukluğu ve hipoglisemi ile kendini gösterir (2).

GA I'de, klasik biyokimyasal fenotip, ağır glutarik asidüri ve plazmada artmış glutarilkarnitinden oluşur. İdrarda glutarilkarnitin ve glutarilglisinlerin değerlendirilmesi, yorumlamaya yardımcı olabilir (3). ETF ve ETF-DH eksikliği, idrarda glutarat, etilmalonat, 3-hidroksiizovalerat, 2-hidroksiglutarat, 5-hidroksihegzonoat, dikarboksilik asitler olan adipat, suberat, sebasat, dodekanedionat ve izovalerilglisin, izobütirilglisin , 2-metilbütirilglisin gibi bir çok metabolitin fazla miktarda atılımı ile sonuçlanır. Laktat sıklıkla mevcut olmakla birlikte, 3-hidroksibütirat ve asetoasetat genellikle bulunmaz ya da eser miktarlarda bulunurlar (2).

2.2.2.4. 2-Hidroksiglutarik Asidüri

2-hidroksiglutarik asid, normal idrarda hem D hem de L konfigürasyonunda bulunur. Aşırı L-2-hidroksiglutarik asidüri ekstrapiramidal hareket bozuklukları ve nöbetler dahil nörolojik hastalıkları olan bir çok hastada bildirilmiştir (46). Primer metabolik kusur bilinmemektedir. D-2-hidroksiglutarik asidüri, yeni doğan döneminde klinik görünümün şiddetli ya da asemptomatik olabildiği, nörometabolik bir hastalıktır (47).

2.2.2.5. 4-Hidroksibütirik Asidüri

4-hidroksibütirik asid, 4-aminobütirik asid (GABA) metabolizmasının otozomal resesif geçişli, nadir görülen bir bozukluğu olan süksiniksemialdehit dehidrogenaz eksikliği bulunan hastaların idrarında birikir. Hastalık klinik olarak mental retardasyon, hipotoni, şiddetli ataksi ve dizatri ile karakterizedir. (48-51).

2.2.2.6. Malonik Asidüri

Gelişme geriliği ile birlikte, kalıtsal malonil-KoA dekarboksilaz eksikliği bulunan az sayıdaki bebekte, idrarda fazla miktarlarda malonik asid atılımı tanımlanmıştır. Bazı çalışmalarda kusura kardiyomyopatinin de eşlik ettiği bulunmuştur (52-53).

2.2.2.7. Etilmalonik Asidüri

Etilmalonat ve C-6 dikarboksilik asid adipat, özellikle ılımlı form MAD eksikliği olan hastaların idrarında belirgin olup, bu durum etilmalonik-adipik asidüri olarak adlandırılmıştır (44). Etilmalonat, metilsüksinatla beraber, kısa zincir açıl-KoA dehidrogenaz eksikliği olan hastaların idrarında da bulunur (54).

Etilmalonik ensefalopati (EE), başlangıçta İtalyan ailelerinde bildirilmiş olan, otozomal resesif geçiş gösteren bir kalıtsal hastalıktır. Burlina ve ark., ısrarlı etilmalonik ve 2-metilsüksinik asidüri, laktik asidoz, ortostatik akrosiyanoz, kronik diare ve ilerleyici nörolojik anormalliklerin yaklaşık 2 yaş civarında üç olguda ölümle sonuçlandığı dört alıılmamış İtalyan hasta tanımlamışlardır (55). Yağ asidi oksidasyonu ile ilgili çalışmaların tümü normal olmakla birlikte, olguların birinde kısmi sitokrom c oksidaz eksikliği bulunmuştur. Garavaglia ve ark. buna ek olarak, hemen hemen aynı klinik özellikler gösteren, izole etilmalonik asidürisi, ısrarlı laktik asidozu ve kas sitokrom c oksidaz eksikliği olan iki italyan hasta tanımlamışlardır (56). Christensen ve ark. ve Lehnert ve Ruitenbeek kas sitokrom c oksidaz eksikliği olan, metilsüksinik asidürisi olmaksızın etilmalonik asidürisi olan başka hastalar da bildirmişlerdir (57, 58).

Bu bulguların kombinasyonu genellikle çoklu mitokondriyal açıl KoA dehidrogenaz enzimlerinin bozukluğuna göstermesine rağmen, yapılan yoğun çalışmalar altta yatan spesifik kusuru açığa çıkarmada yetersiz kalmıştır. 2004 yılında EE gen lokusu tanımlanmıştır ancak mitokondriyal protein olan gen ürününün işlevi henüz aydınlatılamamıştır.

Etilmalonik asidürinin yorumu sıklıkla zordur. Bazı sağlıklı görünümli çocuklar yanı sıra, kalıtsal fruktoz intoleransı ve 3-metilkrotonoil-KoA karboksilaz eksikliği gibi çeşitli kalıtsal metabolik hastalıkları olan bebeklerin idrarında, düşük konsantrasyonlarda etilmalonatın spesifik olmayan bir bulgu olarak yer aldığı bildirilmiştir (59). Gastrointestinal florada rahatsızlığı olan bebeklerde, laktik asid, metilmalonik ve 3- hidroksipropiyonik asidüri ile beraber geçici etilmalonik asidüri bildirilmiştir (60). Bu durumu Lehotay ve Clarke, özellikle akut gastroenteriti olan prematüre bebeklerde gözlemlemiş; sorun enfeksiyonun giderilmesi ile çözünlenmiş ve etilmalonik asidüri ile ilişkili kalıtsal metabolik hastalıklarla ilgili herhangi bir klinik ve biyokimyasal kanıt saptanmamıştır (2).

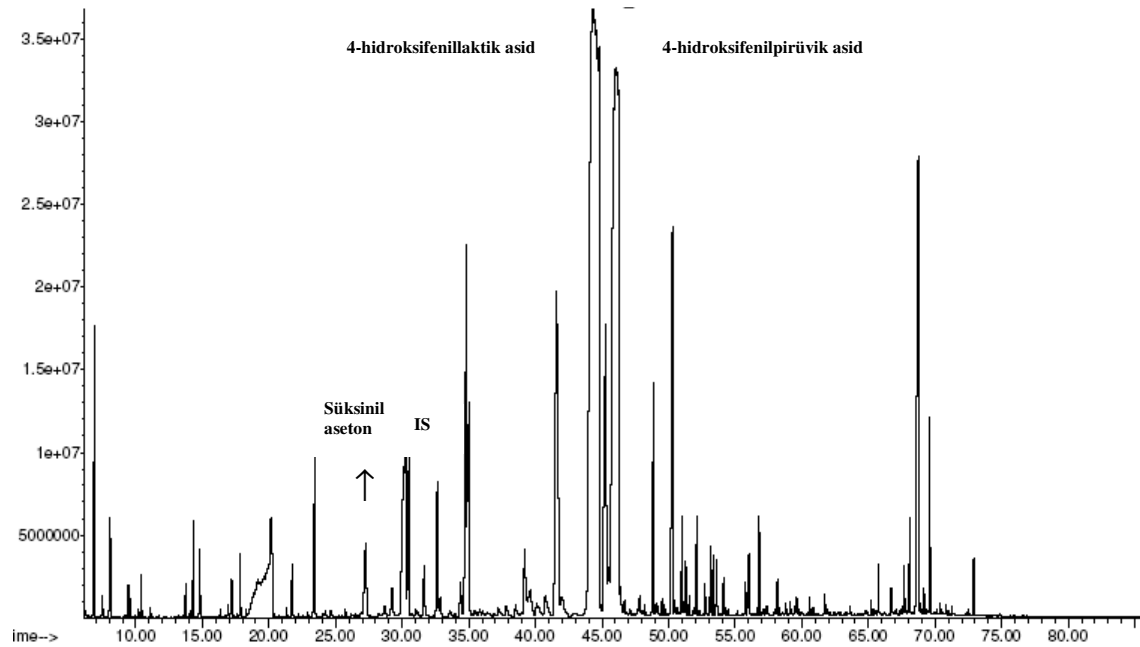
2.2.2.8. *Fumarik Asidüri*

Fumarik asidüri, fumarat hidrataz aktivite eksikliğine bağlı olarak gelişen, ender görülen bir kalıtsal metabolizma kusurudur. İki genç erişkinde, mental retardasyon ve konuşma bozukluğu ile birlikte idrarla ağır ve izole fumarat atılımı bildirilmiştir (61). Daha sonra erken bebeklikte ensefalopati, gelişme geriliği, hipotoni, nöbetler, beyin malformasyonları ve dismorfik yüz özelliklerinin görüldüğü vakalar da bildirilmiştir (62). Büyük miktarlarda fumarat atılımına diğer bir idrar organik asid anormalliğinin eşlik etmemesi ve plazma fumarat konsantrasyonlarının yüksek saptanmamış olması, araştırmacılara primer kusurun, organik asidlerin renal tubuler reabsorbsiyonunda bir bozukluğu düşündürmüştür. Hastalardaki mental sorunların mekanizması ise açık değildir (2).

2.2.2.9. *Süksinilasetonüri*

Süksinilaseton, fumarilasetoasetat (FAA) hidrolaz eksikliğine bağlı olarak gelişen herediter tirozinemi tip I'li hastaların idrarında biriken süksinilasetoasetattan (SAA) köken alır (63). Biriken FAA, enzimatik olarak SAA'ya indirgenir, ve daha sonra enzimatik olmayan bir tepkime ile stabil olan süksinilasetona çevrilir. Tirozinemi tip I'li hastaların idrarı sıklıkla

düşük miktarlarda SAA ve FAA içermesine rağmen, süksinilaseton idrardaki en karakteristik organik asid anormalliğidir (Şekil 6). Herediter tirozinemi tip I'in klinik görünümü genellikle, hipoglisemiye ek olarak anazarka, asit, hiperbilirübinemi, hiperamonyemi ve koagülopatiyi içeren şiddetli karaciğer işlev bozukluğu şeklindedir (64). Plazma amino asidlerinin analizinde, sıklıkla şiddetli hepatosellüler hasarla ilişkili olan, yüksek tirozin, fenilalanin ve metiyonin düzeyleri gibi karakteristik anormallikler gözlenir. Plazma alfa-fetoprotein düzeylerindeki belirgin yükseklik, hastalığın karakteristik özelliklerinden biridir.



Şekil 6: Tirozinemili bir olguda idrar organik asidleri (EÜTF Klinik Biyokimya B.D. Arşivi)

Hastalarda tübüler işlev bozukluğuna bağlı olarak gelişen fosfat kaybının bir sonucu olarak, sıklıkla rahitis gelişir. Süksinilasetona ek olarak idrarda yüksek konsantrasyonlarda 4-hidroksifenilpiruvat ve 4-hidroksifenilpirüvik asid dioksijenazın nonspesifik eksikliğinin bir sonucu olarak, diğer tirozin metabolitleri bulunur. Tanı, karaciğerde FAA hidrolaz ölçümü ile doğrulanır. Herediter tirozineminin yönetimi, yakın geçmişte p-hidroksifenilpirüvik asid dioksijenazın, NTBC olarak adlandırılan bir ürünle, farmakolojik olarak inhibe edilmesi ile çarpıcı bir şekilde değişmiştir. Bu ilaç, muhtemelen FAA ve maleilasetoasetat birikimini engelleyerek hızlı gelişen hepatosellüler hasarı durdurmaktadır (65).

2.2.2.10. Okzalik Asidüri

Hiperokzalik asidüri (veya hiperokzalüri) , çeşitli ilaçlar ve toksinlerin (örneğin askorbik asid, etilen glikol, metoksifloran) alınımına bağlı olarak, inflamatuvar barsak hastalığında artmış intestinal absorbsiyona bağlı olarak ya da diyetle aşırı alım sonrasında görülebilir. Yüksek miktarda okzalat sentezine yol açan iki primer metabolik kusur tanımlanmıştır (66,67). Primer hiperokzalüri tip I, peroksizomal alanin:gliokzilat aminotransferaz eksikliğine bağlı olarak gelişir ve yüksek miktarlarda gliokzilat, glikolat atılımı ile ilişkilidir (68). Etkilenen olgularda, bazen erken bebeklik döneminde olmak üzere, renal kolik ya da asemptomatik hematüri görülebilir. L-gliserik asidüri olarak da adlandırılan primer hiperokzalüri tip II, hidroksipiruvat metabolizmasında çok ender bir kusura bağlıdır ve idrarda L-gliserik asid varlığı ile tip I'den ayırt edilebilir (2). Sekonder hiperokzalüri, etilen glikol zehirlenmesine veya intestinal malabsorbsiyonlu hastalarda, diyetle alınan okzalatın absorbsiyonundaki artışa bağlı olarak gelişir ve okzalat metabolizması ile ilgili primer bozukluklarından çok daha yaygındır (67).

2.2.2.11. N-Asetilaspartik Asidüri

Canavan hastalığı, aspartoçilaz kalıtsal eksikliğine bağlı olarak gelişen, şiddetli ve erken başlangıçlı nörodejeneratif bir hastalık olup, hastalığa sahip olan bebeklerin idrarında değişken derecelerde yüksek N-asetilaspartat düzeyleri saptanır (6,69).

2.2.3. Orta-Zincirli Dikarboksilik Asidüri

Orta-zincirli dikarboksilik asidüri, kalıtsal mitokondrial yağ asidi oksidasyon kusurlarının genel bir özelliğidir (70-73). Mitokondrial yağ asidi oksidasyonu, dört farklı grup enzimin ardışık etkisi ile gerçekleşir. Her bir grup genetik olarak farklı alt gruplardan meydana gelir ve yağ asidi ara ürünlerinin zincir uzunluğuna bağlı olarak, substrat özgünlükleri farklılık gösterir. Mitokondrial beta-oksidasyon kusuru sonucunda biriken yağ asidi ara ürünleri, endoplazmik retikulumda omega oksidasyonla ve peroksizomal beta oksidasyonla kısa zincirli dikarboksilik asidlere okside olurlar. Peroksizomal beta oksidasyonla ilgili enzimler, 6-10 karbondan kısa zincir uzunluğundaki yağ asidlerinin ve dikarboksilik asidlerin

oksidasyonunu katalizleyemediğinden, buna bağlı olarak C-6, C-8, C-10'e karşılık gelen dikarboksilik asidler (adipik, suberik, sebasik asidler) birikerek, idrarda yüksek konsantrasyonlarda atılır. Bu hastalık grubu, klinik olarak, akut karaciğerde işlev bozukluğu, akut ensefalopati ya da miyopati (kardiyomiyopati dahil) bulguları ile birlikte giden hipoketotik hipoglisemi ya da bu bulguların kombinasyonu ile seyreder.

Ayrıca, valproat kullanan çocuklarda, orta zincirli trigliserid (MCT) içeren mamalarla beslenen bebeklerde ve belirgin ketoasidozu olan hastalarda orta zincirli dikarboksilik asidüri, saptanabilir. Bu durumlarda, yüksek miktarlardaki 3-hidroksibütirat ve asetoasetat varlığı, olguların kalıtsal yağ asidi oksidasyon kusuru olan hastalardan ayrılmasını sağlar.

2.2.3.1. Orta-Zincir Açıl-KoA Dehidrogenaz (MCAD) Eksikliği

Dikarboksilik asidüri ile ilişkili kalıtsal yağ asidi oksidasyon kusurlarının en sık görüleni MCAD eksikliğidir (74-78). Bu durum klinik olarak akut başlangıçlı anoreksi ve kusma, stupor ve komaya ilerleyen letarji, hepatosellüler işlev bozukluğu ile giden hepatomegali, hipotoni, hipoglisemi ve hiperammonyemi ile karakterizedir. Bir çok vakada ölüm, ani bebek ölümü sendromundan şüphelenilecek kadar hızlı ve beklenmedik bir şekilde olur (79-81). Bu durum, klinik olarak sıklıkla Reye sendromundan ayrılamaz ve etkilenen birçok çocuk asemptomatiktir (76,78,82,83). Bulguların yaşamın ilk iki yılı içinde başlaması, araya giren önemsiz hastalıklar ve açlık sonucunda kompanze edilemeyen metabolik asidoz, pozitif aile öyküsü, klinisyeni hastada MCAD eksikliği olma olasılığı yönünden uyarmalıdır.

Akut metabolik dekompanzasyon esnasındaki idrar organik asid analizinde, karakteristik olarak yüksek miktarlarda adipat, suberat ve sebasat ve hegzanoat ve oktaonatın (omega-1)-hidroksi türevleri olan 5- hidroksihegzanoat, 7-hidroksioktaonat, ayrıca düşük miktarlarda 3-hidroksibütirat ve asetoasetat varlığı veya yokluğu saptanır (71,84,85). Çocuk bulgusuz dönemde iken yapılan idrar organik asid analizi, tamamen normal bulunabilir. Ancak, etkilenen hastalarda yapılan idrar açilkarnitin ve açilglisin analizinde, klinik durumlarından bağımsız olarak, genellikle oktanoilkarnitin ve hegzanoilglisin ve fenilpropiyonilglisin varlığı saptanır (86-87). İdrarda bu organik asid esterlerinin varlığı, hastalık için hemen hemen patognomonik bir bulgudur. Açilkarnitinlerin ve açilglisinlerin analizi, özellikle kalıtsal yağ asidi oksidasyon kusurlarının tanımlanmasında yararlı bulunmuştur. İdrardaki açilkarnitinlerinin analizi, sadece hastadaki karnitin depolarının yeterli olduğu durumlarda

tanısal olarak güvenilir veriler sağlar. Karnitin yetmezliği, yağ açıl-KoA dehidrogenaz eksikliğinde yaygın bir özellik olduğundan, açilkarnitin analizinin L-karnitin yüklemesinden (100mg/kg) 4-8 saat sonra toplanan idrarda yapılmasını önerenler de vardır. İdrar açilkarnitinlerinin analizi, teknik olarak zor ve hantal bir yöntem olmakla birlikte, MCAD eksikliğinin ve diğer yağ asidi oksidasyon kusurlarının saptanmasında daha duyarlı olabilir (85,87,88). Fenilpropionat ve türevleri muhtemelen intestinal bakteriyel metabolizma ürünleri olup, normal olarak absorbe olur, mitokondriyal beta oksidasyonla metabolize edilirler. İdrar açilglisin analizi ile MCAD eksikliğini daha duyarlı olarak saptayabilmek için, olgulara fenilpropionat yüklenmesini önerenler de bulunmaktadır (89).

Asemptomatik olgularda veya ölüm nedeniyle idrar elde edilemeyen olguların araştırılmasında, plazma veya kurutulmuş kan damlasında organik asid analizi de yardımcı bir yöntemdir. Plazmada orta zincirli, doymamış, on karbonlu yağ asidi olan cis-4-desenoik asid birikiminin, MCAD eksikliği için karakteristik olduğu kabul edilmektedir (90-94). Bir çok toplumda MCAD mutasyonlarının %90'ından fazlası cDNA'nın 985. nükleotid pozisyonunda A-G yer değiştirmesi sonucu 329. kodonda glutamat yerine lizin üretilen tek nokta mutasyonuna bağlıdır (95,96-99). Yaygın olan bu mutant allelin varlığının belirlenmesi, MCAD eksikliğini doğrulamada yararlı olması yanısıra, taşıyıcı bireylerin belirlenmesi için de önem taşımaktadır.

2.2.3.2. Uzun-Zincir Açıl-KoA Dehidrogenaz (LCAD) Eksikliği

LCAD eksikliği olan hastalarda, adipat, suberat ve sebaseata ek olarak, dikarboksilik asidüri C-12 ve C-14 dioik asidlerin atılımını da söz konusudur (100,101). Plazma karnitin düzeyleri azalırken, esterifiye olan karnitin oranı artmaktadır. Akut metabolik dekompanzasyon döneminde idrar veya plazma analizi, uzun zincirli açilkarnitinlerin varlığını gösterir. Bir çok hastada klinik görünüm, MCAD eksikliği veya Reye sendromu ile ilişkili olan bulgulardan farklı olmayabilir. Akut ensefalopati (kusma, letarji, stupor, koma), hipoketotik hipoglisemi, hepatomegali ve hipotoni yaygındır. LCAD eksikliğinde hastalığın başlangıcı genellikle, MCAD eksikliğindekinden daha erken olup, miyopati daha şiddetlidir, ayrıca MCAD eksikliğinde hemen hemen hiç görülmeyen kardiyomiyopati belirgin bir bulgudur (78,102).

2.2.3.3. Kısa-Zincir Açıl-KoA Dehidrogenaz (SCAD) Eksikliği

SCAD eksikliği, MCAD ve LCAD eksikliklerinden çok daha seyrek görülür. Rapor edilen az sayıda hastada, iskelet kas zayıflığı, kardiyomiyopati, nötropeni, metabolik asidoz, büyüme geriliği, gelişme geriliği tanımlanmıştır (103-105). Miyopati, etilmalonik asidüri ve sekonder karnitin yetmezliği olan bir yetişkinde SCAD eksikliği kas dokusunda sınırlı kalmış, deri fibroblast kültürlerinde aktivite normal bulunmuştur (106).

SCAD eksikliği olan bazı bebeklerde hipoglisemi bildirilmiş olmakla beraber, ketogenez normal gibi görünmektedir. SCAD eksikliğinde idrar organik asid paterni değişken miktarlarda etilmalonat, metilsüksinat, adipat varlığı ile karakterize olup (54,103,105), bazı idrarlarda bütirilglisin, bütirilkarnitin de bulunabilir. Dikarboksilik asidüri hastalığının belirgin bir özelliği değildir. SCAD eksikliği gösterilmiş hastalarda gözlenen idrar organik asid paterni, enzim aktivitesi normal olan kişilerde de görülebilir. Bu nedenle kesin tanı için kas ve fibroblastlarda enzim aktivitesinin analiz edilmesi gerekir (54).

2.2.3.4. 3-Hidroksidikarboksilik Asidüri

3-hidroksidikarboksilik asidler, yağ asidlerinin mitokondrial beta oksidasyonundaki ara ürünlerdir. Mitokondri içindeki yağ açıl-KoA esterleri, substrat özgünlükleri yağ asidi zincir uzunluğuna bağlı olan kısa (örn. bütirik asid), orta (örn. oktanoik asid), uzun (örn. hegzadekanoik asid); olmak üzere, 3 adet yağ açıl-KoA dehidrogenazın katalizlediği tepkimelerle Δ^2 ansatüre türevlerine dönüştürülürler. Δ^2 ara ürünlerinin ileri oksidasyonu ise iki tane üç fonksiyonlu enzim; kısa ve uzun zincir enoil-KoA hidrataz/3-hidroksiaçıl-KoA dehidrogenaz/3-oksoaçıl-KoA tiyolaz ile katalizlenir (107,108). Spesifik LCHAD aktivite yetmezliği olan hastalarda, uzun zincir (C-12, C-14) 3-hidroksidikarboksilik asidler ve monokarboksilik asidlerin idrarda birikimi söz konusudur. Hastalığın klinik görünümü değişkendir. Hastalık en yaygın olarak erken bebeklik döneminde, hipoketotik hipoglisemi epizodları, hepatosellüler işlev bozukluğu, miyopati ve kardiyomiyopati ile kendini gösterir (109-115). Ancak 12-24 ay civarı gibi daha geç dönemde, iskelet kası ve kardiyak miyopatinin baskın olduğu formda (116), bazı vakalarda bu bulgulara periferik nöropatinin eşlik etmesi ile de ortaya çıkabilir (117). Bu hastalık grubunun tanı alması, özellikle organik asidürinin geçici olarak ortaya çıkması nedeni ile çok güçtür. İdrar organik asid paterni, akut

metabolik dekompanzasyon dönemleri dışında genellikle normaldir. Semptomatik epizodlar sırasında bile 3-hidroksidikarboksilik asidüri, nadiren, MCAD eksikliği olan bebeklerde görüldüğü gibi belirgin şekilde ortaya çıkmaktadır . Sıklıkla spesifik LCHAD eksikliği olan bir çok hastadan klinik olarak ayıramayan, üç fonksiyonlu enzimin üç aktivitesinin de eksik olduğu hastalar tanımlanmış olup, bu olguların idrar organik asid profili oldukça benign olup, sadece düşük miktarlarda etilmalonik asid, adipik ve suberik asid saptanır (118) .

LCHAD eksikliğinin, gebelikteki akut karaciğer yağlanması patogenezi ile ilişkili olduğu saptanmıştır (119,120). LCHAD eksikliği yönünden heterozigot olan bir kadın, bu hastalık yönünden homozigot olan bir fetusa hamile ise, şiddetli akut yağlı karaciğer gelişme riski oldukça yüksek olabilir. LCHAD eksikliği olan hastalar ile MCAD eksikliği olan hastalar arasındaki klinik farklılıklar, ayrıca kısmi LCHAD aktivite eksikliğinin gebelikteki akut yağlı karaciğer ile olan ilişkisi, 3-hidroksiaçil-KoA dehidrogenaz eksikliğinin sadece yağ asidi oksidasyon kusuruna bağlı olmadığını göstermekte olup; patolojinin doku dağılımı ve klinik şiddeti, şiddetli doku spesifik toksisiteye yol açan, henüz tanımlanmamış bazı ara ürünlerin birikimini düşündürmektedir.

Kısa zincir 3-hidroksiaçil-KoA dehidrogenaz (SCHAD) eksikliği son derece nadir görülür. Bildirilen tek vaka kas zayıflığı, intermittan rabdomyoliz, ensefalopati ve kardiyomiyopati öyküsü olan bir genç kızdır (121). Organik asidüri sadece geçici dönemlerde ortaya çıkmış olup, hastalığının klinik şiddeti ile uyum göstermemiştir. Patern, LCHAD eksikliğindeki organik asidüriye benzemektedir.

Bir çok araştırmada, hepatosellüler hastalığın akut fazında idrarlarında yüksek düzeylerde 3-hidroksi-dodekandioik asid saptanan, ancak altta yatan hepatopati düzelince ortadan kalkan ve LCHAD aktivitesi normal olan çok sayıda hasta bebekle karşılaşılmıştır. Uzun zincir 3-hidroksidikarboksilik ve monokarboksilik asidüri, ayrıca sekonder bir durum olarak, tip III glikojen depo hastalığı ve mitokondriyal solunum zinciri kusuru olan bazı hastalarda da bildirilmiştir (122,123).

Uzun zincir 3-hidroksidikarboksilik ve monokarboksilik asidürinin yorumlanması zordur. Klinik görünüm güçlü bir şekilde kalıtsal mitokondriyal yağ asidi beta oksidasyon kusurunu düşündürse de, ilgili enzimin spesifik analizi ile doğrulama yapılmalıdır. Bu analizler için uygun olan örnek deri fibroblast kültürüdür.

2.2.4. Aromatik Organik Asidüri

2.2.4.1. Fenilpiruvik Asidüri (ve Fenillaktik Asidüri)

Fenilpiruvik asid ve fenillaktik asid, fenilalaninin transaminasyonundan elde edilirler. Bu bileşikler ilk olarak, en yaygın görülen kimsayal anormalliklerden biri olan, kalıtsal fenilalanin hidroksilaz eksikliğine bağlı fenilketonürde (PKU) idrarda yüksek düzeylerde tanımlanmıştır. Hastalığın tanısı, plazmada yüksek fenilalanin düzeylerinin gösterilmesi ve enzimin pteridin kofaktörü olan tetrahidrobiopteridin metabolizması ile ilgili primer bir kusurun dışlanması ile konulmaktadır(2).

2.2.4.2. Fenilasetik Asidüri

İdrardaki fenilasetatın en büyük bölümü, bakteriyel metabolizmadan ve barsaktan absorpsiyondan köken alır. Fenilasetat, PKU'li hastaların idrarlarında minor bir bileşen olarak birikir. Şiddetli hepatosellüler hastalığı olan hastalarda da büyük miktarlarda bir atılım saptanabilir (2).

2.2.4.3. 4-Hidroksifenilpiruvik Asidüri (ve 4-Hidroksifenillaktik Asidüri)

4-hidroksifenilpiruvik asid (4-HPPA) tirozinin transaminasyonundan köken alır. Birikim, 4-HPPA'nın homogentisik aside dönüşümünü katalizleyen 4-hidroksifenilpiruvik asid dioksijenaz enzimindeki eksikliğe bağlı olarak görülür. Tepkime, askorbik asid varlığına ihtiyaç duyar ve aromatik halkanın hidroksilasyonu, yan zincirin göçü ve yan zincirdeki piruvatın asetata oksidasyon ve dekarboksilasyonunu bir arada içermektedir. Prematüre bebeklerde, gelişimsel imamatüriteye bağlı olarak kısmi enzim eksikliği yaygın olarak görülür. Bu durum plazmada yüksek tirozin ve fenilalanin düzeyleri, idrarda yüksek miktarlarda 4-hidroksipiruvat atılımı ile seyreden geçici hipertirozinemi ile sonuçlanır. Prematüritenin diğer komplikasyonları dışında, yeni doğanın geçici hipertirozinemisi genellikle iyi seyirlidir. Birkaç gün yüksek dozda askorbik asid tedavisi, genellikle organik asidürinin ortadan kalkmasını sağlar.

Etiyolojisi ne olursa olsun hepatosellüler işlev bozukluğu da 4-hidroksifenilpiruvik asidürinin sık görüldüğü diğer bir durumdur. Bebeklerde, tip I herediter tirozineminin, diğer şiddetli hepatosellüler hastalık nedenlerinden ayırt edilmesi zor olabilir. Şiddetli karaciğer hastalığında, genellikle tirozin ve fenilalanin düzeyleri yüksektir ve 4-hidroksifenilpiruvat ve diğer tirozin metabolitlerinin atılımı şiddetli olabilir. Bununla beraber tip I herediter tirozinemide, plazma alfa-fetoprotein düzeyleri belirgin derecede yüksektir ve idrar organik asid analizinde, diğer durumlarda ortaya çıkmayan bir bileşik olan süksinilaseton varlığı saptanır.

4-hidroksifenilpiruvik asidüri, herediter tirozinemi tip III olarak sınıflandırılan, primer 4-HPPA dioksijenaz eksikliğine bağlı olarak gelişen, çok ender bir hastalıkta da görülür. Hastalık, klinik olarak ılımlı mental retardasyon ve aralıklı olarak gelişen ataksi ile karakterizedir (124,125). Sitozolik tirozin transaminazın kalıtsal eksikliği ise herediter tirozinemi tip II olarak sınıflandırılır (Richner-Hannart sendromu ya da okülokutanöz tirozinemi olarak ta adlandırılır) ve korneal erezyonlar, opaklaşma, skarlaşma ile beraber, avuç içi ve ayak tabanında ağrılı veziküller ve hiperkeratoz ile karakterizedir. Mental retardasyon ise sabit olmayan bir bulgudur (2).

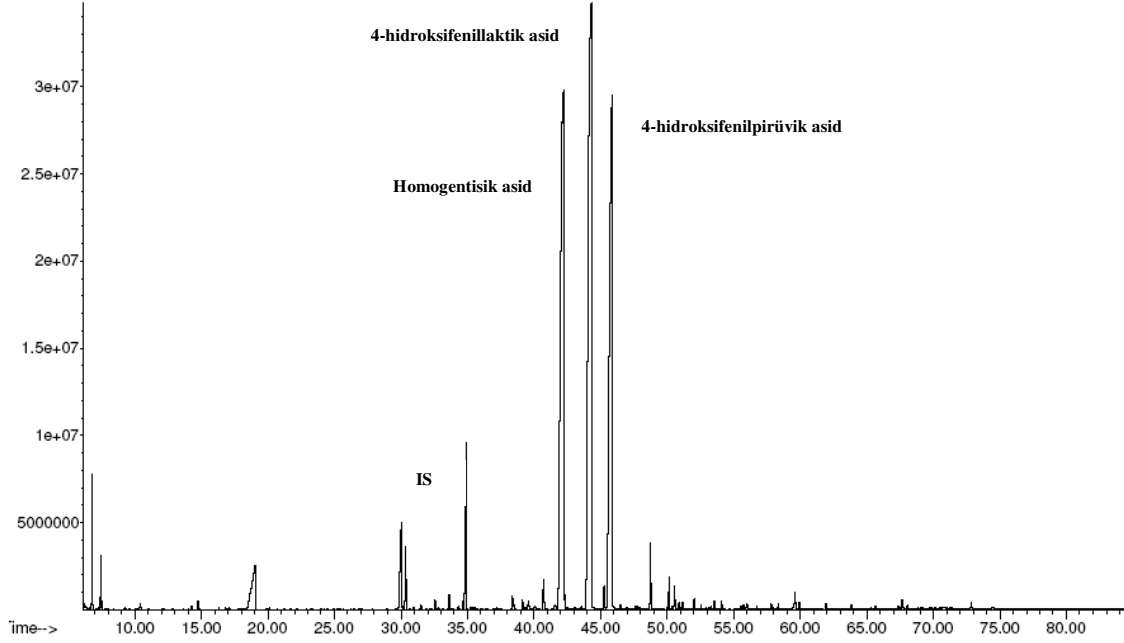
2.2.4.4. Homogentisik Asidüri

Homogentisik asid, fenilalanin ve tirozin metabolizmasından köken alır. Homogentisik asid oksidazın primer eksikliğine bağlı olarak gelişen alkaptonüri hastalarında birikir ve idrarla atılır (Şekil 7). Karakteristik olarak, hastaların idrarı, hava ve ışığa maruz kalınca, kararır. Homogentisik asidin kollagen çapraz bağları üzerine etkisinin sonucu olarak geç gelişen dejeneratif eklem hastalığına rağmen, göreceli olarak benign bir durumdur (2).

2.2.4.5. Ksantürenik Asidüri

Ksantürenik asid, triptofan metabolizmasında bir ara ürün olan 3-hidroksikinürenin'den köken alır. Kinüreninaz, 3-hidroksikinüreninin 3-hidroksiantranilik aside dönüşümünü katalizleyen, pridoksin bağımlı bir enzimdir; pridoksin eksikliği, triptofan yüklenmesine bir yanıt olarak, artmış kinürenin, 3-hidroksikinürenin ve ksantürenik asid atılımı birliktedir (126). Aynı enzimde pridoksine dirençli olan bir kusur bulunması, ksantürenik asidürinin de aynı zamanda

görüldüğü hidroksikinüreninürinin nedeni olabilir (127). Ksantürenik asidürlü bazı hastaların zihinsel özürlü olmasına rağmen, bu metabolik anormallik klinik olarak benign seyirlidir.



Şekil 7 : Alkaptonuri olgusunda idrar organik asitleri (EÜTF Klinik Biyokimya B.D. Arşivi)

2.2.5. Laktik Asidüri

İdrarda yüksek miktarda laktik asidin bulunması, idrar organik asid analizinde karşılaşılan en yaygın anormalliklerden biridir (Tablo 1).

2.2.5.1. Laktat Metabolizmasının Edinsel Bozuklukları

Sistemik laktik asidoz, birçok edinsel hastalığın özelliğidir. Doku perfüzyonunun yeterli gibi görüldüğü bir çok şiddetli sistemik hastalığın bir özelliği olmasına rağmen, Cohen Woods tarafından tip A olarak adlandırılan ve doku hipoksisine bağlı gelişen laktik asidoz, muhtemelen laktik asidürinin en sık görülen nedenidir (2). Hipoksiye bağlı laktik asidoz genellikle hipoksik durumun düzeltilmesiyle hızla geri dönerken, kalıtsal metabolik kusurlara bağlı laktik asidoz, genellikle tedaviye daha dirençlidir.

Laktik asidoz sistemik bir hastalıkla ilişkili olduğunda, parenkimal karaciğer hasarı gibi öncelikli olan durum, yağ asidi oksidasyon kusuru, herediter tirozinemi ya da laktat metabolizmasının bazı primer bozuklukları gibi kalıtsal bir metabolik hastalığa bağlıysa, tanınan zorluk yaşanabilir. Laktik asidoz salisilizm, akut etanol, metanol zehirlenmelerinin ya da etilen glikol alınınının da spesifik bir özelliğidir. Ayrıca yüksek konsantrasyonda karbonhidrat infüzyonu yapılmış, yetersiz beslenmiş bebeklerde ve total parenteral nutrisyon (TPN) alan hastalarda da rastlanabilir (2,128).

2.2.5.2. *Laktat Metabolizmasının Kalıtsal Kusurları*

Laktik asidozlu hastaların göreceli olarak küçük bir bölümü kalıtsal metabolizma kusurları ile açıklanabilir, ancak asidozu ısrarlı olan hastalarda bu oran oldukça yüksektir (2). Laktat, laktat dehidrogenazın (LDH) katalizlediği, NADH bağımlı bir tepkime ile, piruvatın indirgenmesinden elde edilir (129). Tepkime geri dönüşümlüdür ve yeterli NAD^+/NADH konsantrasyonlarında hızla termodinamik dengeye ulaşır. Laktat ayrıca kör uç özelliğinde bir metabolittir, yani metabolik olarak ortadan kaldırılması sadece öncülü olan piruvat üzerinden gerçekleşir. Laktatın verilen herhangi bir kompartmandaki sabit konsantrasyonu, direkt olarak piruvat, NAD^+ ve NADH düzeyleri ile orantılıdır. Laktik asidozla ilişkili kalıtsal metabolizma kusurları, piruvat birikime bağlı olanlar, NADH birikimine bağlı olanlar ya da her iki ürünün birikimine yol açan kusurlar olarak sınıflandırılabilir. Birikim, ortadan kaldırılma kusuruna bağlı veya bileşiklerden herhangi birinin artmış üretimine bağlı olabildiği gibi, her iki durum bir arada da bulunabilir.

Piruvatın ortamdan uzaklaştırılmasındaki bir kusura bağlı olarak birikimi, piruvat oksidasyonundaki primer bozukluklar olan piruvat karboksilaz eksikliği, PDH eksikliği ve PDH fosfataz eksikliğinde, laktik asidozun temel sebebidir. Glukoneogenez bozuklukları gibi, sekonder laktik asidoz ile giden kalıtsal metabolik kusurlarda, piruvat birikiminin mekanizması çok net değildir ve muhtemelen piruvat üretimindeki artış yanı sıra, uzaklaştırılmasındaki azalma ile ilişkilidir. Nedeni ne olursa olsun, piruvat birikimi birlikte giden laktik asidozda, piruvatın geri dönüşümlü transaminasyonuna bağlı olarak, plazmada alanin düzeylerindeki artış da eşlik eder (2).

Tablo 1 : Laktik Asidozun Klinik Sınıflandırması (2)

Edinsel	Kalıtsal metabolik kusurlar
<i>Hipoksemi</i>	<i>Primer</i>
Dolaşım kollapsı	<i>Piruvat metabolizması kusurları</i>
Şok	PDH eksikliği
Konjestif kalp yetmezliği	Piruvat karboksilaz eksikliği
	PDH fosfataz eksikliği
	<i>NADH oksidasyon kusurları</i>
	Mitokondrial elektron transport kusurları
<i>Şiddetli sistemik hastalık</i>	<i>Sekonder</i>
Karaciğer yetmezliği	<i>Glukoneogenez bozuklukları</i>
Böbrek yetmezliği	Glikojen depo hastalığı, tip I
Diabetik ketoasidoz	Hereditör fruktoz intoleransı
Akut pankreatit	PEP-karboksikinaz eksikliği
Akut lösemi	Fruktoz 1,6 difosfataz eksikliği
<i>İntoksikasyon</i>	<i>Yağasidi oksidasyon kusurları</i>
Etanol	<i>Biyotin metabolizması kusurları</i>
Metanol	Biyotinidaz eksikliği
Etilen glikol	Holokarboksilaz sentetaz eksikliği
Oral hipoglisemik ilaçlar	<i>Organik asid metabolizması kusurları</i>
Asetilsalisilik asid	HMG-KoA liyaz eksikliği
<i>Besinsel eksiklik</i>	Propiyonik asidemi
Tiamin eksikliği	Metilmalonik asidemi
	Diğer organik asidopatiler

NADH birikimine bağlı gelişen laktik asidoz, kalıtsal mitokondriyal elektron transport zinciri bozukluklarının bir özelliğidir (2). Elektron transport kusuru olan hastalarda piruvat üretimi de artmıştır, ancak bu artış, NADH birikimine göre daha hafiftir. Sonuç olarak, bu hastaların kanında laktat/piruvat oranı karakteristik olarak artmıştır. Elektron transport kusuru olan hastalarda laktik asidozun derecesi değişken olmakla birlikte, nadiren primer piruvat metabolizma bozukluğu olanlar kadar şiddetlidir. Nedeni ne olursa olsun, şiddetli laktik asidoza, sıklıkla düşük ya da ılımlı miktarlarda 2-hidroksibütirat atılımı da eşlik etmekte olup, bu ürün, muhtemelen metiyonin, homosistein, homoserin ve treoninden elde edilmektedir

(130). Bu şartlarda, bu bileşimin idrarda bulunması, 2-hidroksibütirat metabolizmasındaki primer bir kusurdan kaynaklanmamaktadır.

2.2.5.3. *D-Laktik Asidüri*

Metabolik asidozu olan, ancak enzimatik tekniklerle kan laktat düzeyi normal bulunan hastalarda, GC gibi fizikokimyasal analitik yöntemlerle laktik asid konsantrasyonlarının yüksek saptanması, biriken ürünün, barsak stazı olan hastalarda biriken bakteriyel bir metabolit olan, D-laktat olduğunu düşündürür (131,132). Bu bileşimin birikimi, bazı vakalarda ensefalopati nedeni olabilmektedir (133,134).

2.2.6. Ketonüri

Ketonüri (yüksek düzeylerde asetoasetat ve 3-hidroksibütirat atılımı), açlığa karşı fizyolojik bir yanıt olarak veya glukoz oksidasyonundaki primer ya da sekonder kusurlara bağlı olarak artan yağ asidi oksidasyonunun bir yansımasıdır (2). Genellikle 3-hidroksiizobütirat, 3-hidroksiizovalerat, 2-hidroksibütirat ve dikarboksilik asitlerden özellikle C-14 zincir uzunluğuna kadar olan 3-hidroksi türevleri eşlik etmektedir (4). Organik asid metabolizmasındaki bir çok kalıtsal kusurda, glukoz kullanımında sekonder kusurlar bulunmakta olup, akçaağaç şurubu hastalığı, metilmalonik ve propiyonik asidemi gibi hastalıklarda asetoasetat ve 3-hidroksibütiratın artmış atılımı, sık görülen bulgulardır. Ketozis, nedeni ne olursa olsun, dikarboksilik asitler, adipat, suberat ve sebaseat atılımında artış ile birliktedir (2). Dikarboksilik asidürinin eşlik etmesi, keton cisimlerinin yüksek konsantrasyonları haricinde, uzun zincir 3-hidroksiaçıl-KoA dehidrogenaz ya da üç fonksiyonlu protein eksiklik profilini taklit edebilir. Yağ asidi oksidasyon kusurlarında açlık döneminde keton cisimleri idrarda çok yüksek düzeylerde bulunabilir, fakat durumla uyumsuz olarak ketozis düşük düzeylerde kalır ve idrarda adipat/3-hidroksibütirat oranı >0.5 'tir (4).

Mitokondrial asetoasetil-KoA tiyolaz (beta-ketotiyolaz) eksikliğinde, keton kullanımında primer bir kusurun sonucu olarak ağır ketonüri görülür. Etkilenmiş hastalar, genellikle araya giren enfeksiyonlar ve açlığın hızlandırdığı intermittant metabolik dekompanzasyon dönemleri arasında tamamen normaldir. Metabolik dekompanzasyon inatçı kusma, letarji, uykuya meyil, hipoglisemi ile birlikte taşipne, metabolik asidoz ve ağır ketonüri başlamasıyla

ortaya çıkar. İdrar organik asid analizinde yüksek miktarlarda 3-hidroksibütirat ve asetoasetata ek olarak 2-metilasetoasetat ve 2-metil-3-hidroksibütirat varlığını saptanır (2).

2.2.7. 5-Oksoprolinüri

5-oksoprolinüri (piroglutamik asidüri) glutatyon sentaz eksikliğine bağlı gelişen, ender görülen kalıtsal bir metabolik hastalıktır. Erken bebeklik döneminde kronik hemolitik anemi ile birlikte dirençli veya akut metabolik asidoz ile ortaya çıkabilir (135). Daha büyük hastalarda hastalık, mental özrürlük, spinoserebellar dejenerasyon, periferel nöropati ve miyopati zemininde, akut metabolik dekompanzasyon ile kendini gösterebilir. Bazı olgular tamamen asemptomatik olabilir. Oksoprolinüri ayrıca, asetaminofen ve antikonvülzan bir ilaç olan vigabatrin kullanımı ile de ilişkili olabilir (136,137).

2.2.8. Mevalonik Asidüri

Mevalonik asid, dolikoller, ubikuinon ve kolesterolün izoprenoid öncüllerinin biyosentezinde merkezi ara üründür. Şiddetli mevalonik asidüri, nadir görülen otozomal resesif bir hastalık olan mevalonat kinaz eksikliğinde görülür (138). Önemli derecede etkilenen bebeklerde, gelişme geriliği, dismorfik özellikler, katarakt, hepatosplenomegali, anemi, intestinal malabsorbsiyon ve büyüme geriliği ile karakterizedir. Hastalığın daha az şiddette seyrettiği hastalar mental retardasyon, miyopati, ataksi, serebellar atrofi sergilerler ve tüm hastalar ateş, lenfadenopati, artralji, ödem ve deri döküntüleri ve yüksek eritrosit sedimentasyon hızının eşlik ettiği tekrarlayan epizodlara maruz kalırlar. İdrar organik asid analizinde belirgin derecede yüksek mevalonik asidüri bulunur. Plazma ubikuinon-10 düzeyleri genellikle azalmıştır fakat kolesterol düzeyleri normaldir. Plazma lökotrien E₄ düzeyleri daima yüksektir.

2.2.9. Havskinsinüri

Havskinsin, [(2-L-sistein-S-yl-1,4-dihidroksisikloheks-5en-1-yl)-asetikasid], 1,4-dihidroksisikloheksilasetik asidden elde edilir ve 4-HPPA'nın homogentisik aside enzimatik oksidasyonunda geçici bir ara ürün gibi görünmektedir (139). Havkinsinüri, otozomal

dominant geçişli olduğu belirtilen, ender görülen bir organik asidopatidir (140). Bebeklik döneminde belirgin büyüme geriliği ile ilişkili ısrarlı metabolik asidozla kendini gösterir. Etkilenen hastaların idrarı havskinsine ek olarak 4-hidroksisikloheksilasetik asid içerir. Protein alımı kısıtlanmış ve askorbik asid ilave edilmiş bir diyet, semptomların önemli derecede azalmasını sağlar (2).

Tablo 2 : Sınırdaki yükseklik durumunda özel dikkat, tekrar ve ileri araştırma gerektiren kilit organik asitler (1)

<i>Yükselen bileşik</i>	<i>Dikkat edilmesi gereken bozukluk</i>
N-asetil aspartik asid	M. Canavan
Etilmalonik asid	Mitokondriyal bozukluklar
	Kısa zincirli açıl-KoA dehidrogenaz eksikliği
Fumarik asid	Fumarik asidemi
Glutarik asid	Glutaril-KoA dehidrogenaz eksikliği
3-OH-Glutarik asid	
Glutakonik asid	
4-Hidroksibütirik asid	4-Hidroksibütirik asidemi
4-Hidroksisikloheksilasetik asid	Hawkinsinüri
3-Hidroksidikarboksilik asitler	Uzun-zincirli 3-hidroksiaçıl-KoA dehidrogenaz eksikliği
3-Hidroksiizovaleik asid	Biyotin metabolizması bozuklukları
Malonik asid	Malonil-KoA dekarboksilaz eksikliği
Metilsitrik asid	Propiyonat metabolizması bozuklukları
3-Metilglutakonik asid	3-Metilglutakonik asidemiler
2-Metil-3-hidroksibütirik asid	3-Oksotiolaz eksikliği
Tiglitlisin	
2-Metilasetoasetik asid	
Metilmalonik asid	B12 vitamini metabolizması bozuklukları
Suberik asid	Orta zincirli açıl-KoA Dehidrogenaz eksikliği
Sebasik asid	
Hekzanoilglisin	
Fenilpropionilglisin	
Desenedioik	Çok uzun zincirli açıl-KoA Dehidrogenaz eksikliği
Dekadienedioik asid	
Süksinilaseton	Tirozinemi Tip I

Tablo 3: Organik asid metabolizma bozukluklarının klinik ve laboratuvar özellikleri (K) Kan, (İ) İdrar (3)

<i>Genel ismi</i>	<i>Enzim/transport kusuru</i>	<i>Temel klinik özellikler</i>	<i>Temel biyokimyasal belirteçler</i>
Propiyonat metabolizması ve ilgili kofaktör bozuklukları			
Propiyonik asidemi	Propiyonil-KoA karboksilaz (altünite alfa,beta)	Büyüme gelişme geriliği, hipotoni, nötrope	GLY, propiyonilkarnitin (K), metilsitrik, 3-OH propiyonik, propiyonilglisin, tiglilglisin (İ)
Çoklu karboksilaz eksikliği	Holokarboksilaz sentaz	Alopesi, ağız çevresinde deri kayıpları, gelişme geriliği, hipotoni, nöbetler, solunum problemleri	Laktik C5-OH açkarnitin (K), 3-OH izovalerik, 3-metilkrotonilglisin, 3-OH propiyonik, metilsitrik, laktat, tiglilglisin (İ)
Metilmalonik asidemi (mut 0 ve mut)	Metilmalonil-KoA mutaz	Büyüme ve gelişme geriliği, anoreksi, hipotoni	GLY, MMA, propiyonilkarnitin (K), MMA, metilsitrik, 3-OH propiyonik, propiyonilglisin (İ)
Metilmalonik asidemi (cb1A)	Mitokondrial kobalamin redüktaz	Büyüme ve gelişme geriliği, anoreksi, hipotoni	GLY, MMA, propiyonilkarnitin (K), MMA, metilsitrik, 3-OH propiyonik, propiyonilglisin (İ)
Metilmalonik asidemi (cb1B)	Kob(I)alamin transferaz	Büyüme ve gelişme geriliği, anoreksi, hipotoni	GLY, MMA, propiyonilkarnitin (K), MMA, metilsitrik, 3-OH propiyonik, propiyonilglisin (İ)
Metilmalonik asidemi (cb1C ve cb1D)	Metilfolat-H(4) metiltransferaz; metilmalonil-KoA izomeraz	Büyüme ve gelişme geriliği, hipotoni, megaloblastik anemi, hemolitik üremik sendrom	GLY, MMA, tHcy, propiyonilkarnitin (K), MMA, metilsitrik, 3-OH propiyonik, propiyonilglisin (İ)
Metilmalonik asidemi (cb1F)	Lizozomal salınım	Büyüme ve gelişme geriliği, anoreksi, hipotoni	MMA (B,U)
Metilmalonik asidemi (cb1H)	Adenozilkobalamin sentezi	Büyüme ve gelişme geriliği, anoreksi, hipotoni	GLY, MMA, propiyonilkarnitin (K), MMA, metilsitrik, 3-OH propiyonik, propiyonilglisin (İ)
Dallı zincirli amino asid metabolizması ile ilgili diğer bozukluklar			
İzovalerik asidemi	İzovaleril KoA dehidrogenaz	Epizodik kusma, letarji, koma, terli ayak kokusu	İzovalerilkarnitin (K), 3-OH izovalerik, izovalerilglisin (İ)
3-Metilkrotonilglisinüri	3-Metilkrotonoil-KoA karboksilaz	Epizodik kusma, letarji, koma	C5-OH açkarnitin (K), 3-OH izovalerik, 3-metilkrotonilglisin (İ)
3-Metilglutakonik asidüri	3-Metilglutakonil-KoA hidrataz	Konuşma kusuru, mental retardasyon, hipertoni, spastisite	C5-OH açkarnitin (K), 3-OH izovalerik, 3-metilglutakonik, 3-metilglutarik (İ)
3-Hidroksi-3-metilglutarik asidüri	3-Hidroksi-3-metilglutaril-KoA liyaz	Epizodik kusma, hipotoni, hipoglisemi, metabolik asidoz, hepatomegali	C5-OH açkarnitin (K), 3-OH izovalerik, 3-metilglutakonik, 3-OH-3-metilglutarik (İ)
2-Metilbütirilglisinüri	2-Metilbütiril-KoA dehidrogenaz	Gelişme geriliği, nöbet, ilerleyici kas zayıflığı. Semptom olmaması da muhtemeldir	C5-açkarnitin (K), 2-metilbütirilglisin (İ)
2-Metil-3-hidroksibütirik asidüri	2-Metil-3-hidroksibütiril-KoA dehidrogenaz	Motor mental becerilerde ilerleyici kayıp	C5-OH açkarnitin (K), 2-metil-3-OH-bütirik asid, tiglilglisin (İ)
Beta-ketotiyolaz eksikliği	Beta-ketotiyolaz	Epizodik kusma, letarji, hipotoni, mental retardasyon, konuşma kusuru	C5-OH açkarnitin (K), 2-metil-3-OH-bütirik asid, 2-metilasetoasetik asid, tiglilglisin (İ)

Tablo 3 (devamı): Organik asid metabolizma bozukluklarının klinik ve laboratuvar özellikleri (K) Kan, (İ) İdrar (3)

<i>Genel ismi</i>	<i>Enzim/transport kusuru</i>	<i>Temel klinik özellikler</i>	<i>Temel biyokimyasal belirteçler</i>
Dallı zincirli amino asid metabolizması ile ilgili diğer bozukluklar (devam)			
İzobutirilglisinüri	İzobutiril-KoA dehidrogenaz	Anemi, dilate kardiyomiyopati	C4 açilkarnitin (K), izobütirilglisin tutarsız derecede yüksek (İ)
3-hidroksiizobütirik asidüri	3-hidroksiizobütiril-KoA dehidrogenaz ya da metilmalonik semialdehid dehidrogenaz	Kongenital anomaliler, boy kısalığı, hipotoni	3-OH izobütirik, 2-etilhidrakrilik (İ)
Metilmalonik asidüri (atipik)	Metilmalonik semialdehid	Gelişme geriliği	NORMAL propiyonil karnitin (K), MMA (İ)
Çeşitli organik asid metabolizması bozuklukları			
Alkaptonüri	Homogentisik asid dioksigenaz	Artrit, okronozis	Homogentisik (İ)
Biyotinidaz eksikliği	Biyotinidaz	Alopesi, periorifisiyal deride döküntü, konjonktivit, gelişme geriliği, hipotoni	Biyotinidaz (K), 3-OH izovalerik (İ)
4-OH butirik asidüri	Süksinik semialdehid dehidrogenaz	Gelişme geriliği, ataksi, hipotoni, nöbet, hiperkinetik davranış	4-OH butirik asid (İ)
Kanavan hastalığı	N-aspartoasilaz	Hipotoni, gelişme geriliği, makrosefali, optik atrofi, nöbet, ilerleyici nörolojik dejenerasyon	NAA (İ)
Etilmalonik ensefalopatisi	Bilinmiyor (ETHE1 gen)	Hipotoni, spastik tetrapareziler, peteşi, ortostatik akrosiyanoz, diyare	C4,C5 açilkarnitinler (K), EMA, izobütirilglisin, 2-metilbutirilglisin (İ)
Glutarik asidemi tip I	Glutaril-KoA dehidrogenaz	Makrosefali, hipotoni, anormal hareketler, frontotemporal atrofi, bazal gangliyon lezyonları	C5-DC(glutaril) açilkarnitin (K,İ), glutarik asid, 3-OH glutarik (İ)
Gliserolüri (X'e bağlı)	Gliserol kinaz	Büyüme geriliği, epizodik kusma, gelişme geriliği, kemik kırıkları	Psödohipertrigliseridemi (K), gliserol (K,İ)
Hiperokzalüri tip I	Alanin:gliokzalat aminotransferaz	Ürolitiazis, nefrokalsinozis, renal yetmezlik	Okzalik glikolik (İ)
Hiperokzalüri tip II	D-gliserik dehidrogenaz	Ürolitiazis, hematüri, idrar yolları enfeksiyonları, nadiren nefrokalsinozis ve renal yetmezlik	Okzalik gliserik (İ)
2-ketoadipik asidüri	2-ketoadipik dehidrogenaz	Gelişme geriliği veya hiç semptom olmaması mümkün	2-ketoadipik, 2-OH adipik, 2-aminoadipik (İ)

Tablo 3 (devamı): Organik asid metabolizma bozukluklarının klinik ve laboratuvar özellikleri (K) Kan, (İ) İdrar (3)

<i>Genel ismi</i>	<i>Enzim/transport kusuru</i>	<i>Temel klinik özellikler</i>	<i>Temel biyokimyasal belirteçler</i>
Çeşitli organik asid metabolizması bozuklukları (devam)			
Malonikasidemi	Malonil-KoA dekarboksilaz	Boy kısalığı, kardiyomiyopati, GI semptomlar, hipotoni, gelişme geriliği	C3-DC (malonil) açilkarnitin (K), malonik, metilmalonik, 3-metilglutakonik (İ)
Proglutamikasidüri	Glutasyon sentaz	Mental retardasyon, ataksi, spastik tetraparezi, nöbetler	Piroglutamik (İ)
Mevalonikasidüri	Mevalonat kinaz	Büyüme gelişme geriliği, ataksi, hipotoni, hepatosplenomegali, deri döküntüleri, diyare	Mevalonik, mevalonolakton (İ)

2.3. SEKONDER ORGANİK ASİDÜRİLER VE KARNİTİN YETMEZLİKLERİ

İlaçlar, diyet gibi bir çok edinsel ve genetik durumlar, anormal organik asid atılımına neden olmaktadır (2,4). Bunların büyük bir bölümüne, semptomatik sekonder karnitin yetmezliği eşlik etmektedir (2).

2.3.1. İlaçlar

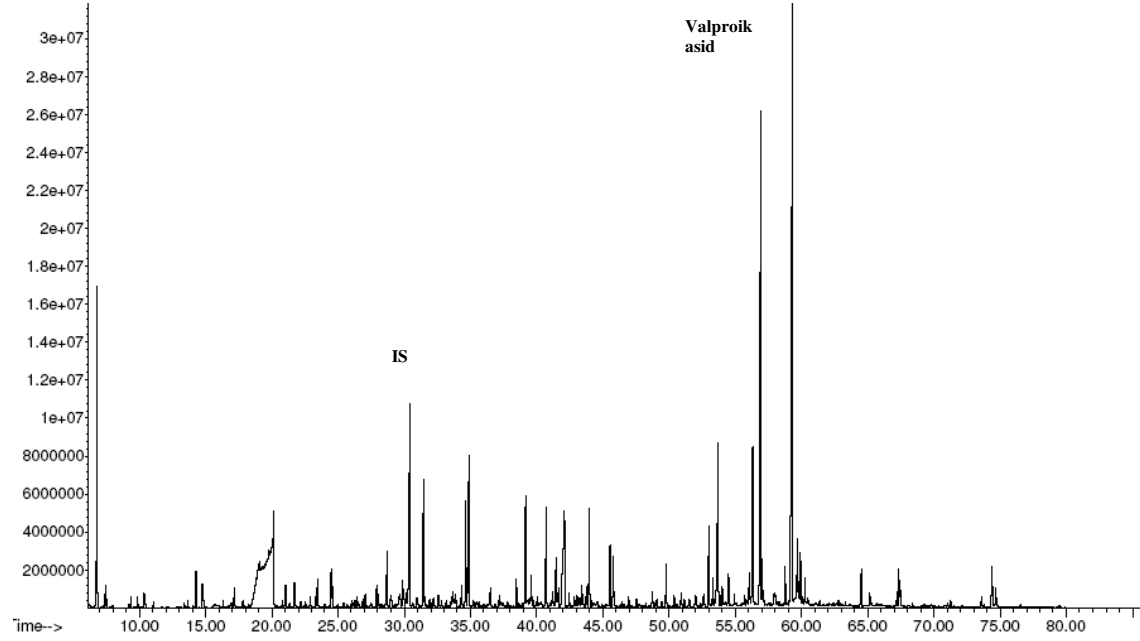
2.3.1.1. Valproik Asid

Valproat (dipropilasetat, VPA) sekiz karbonlu dallı zincirli bir yağ asidi olup, çocuklarda ve erişkinlerde yaygın olarak kullanılan bir antiepileptiktir. Başlıca karaciğerde metabolize olmakta ve çeşitli metabolik yollarda biyotransformasyona uğramaktadır. Beta oksidasyon ve glukuronidasyon temel yollar iken, omega ve omega-1 oksidasyon minor yollardır (141). Valproat, KoA esterlerine aktive olduktan sonra, yaygın olarak mitokondri ve peroksizomlarda metabolize edilmektedir (142). İnsanlarda oral alınan VPA'nın %75'i 24 saat içinde valproil glukuronid olarak atılmakta, kalanı ise idrarla valproilkarnitin ve diğer metabolitler halinde atılıma uğramaktadır (Şekil 8) (143).

Valproat alımı, dallı zincirli amino asid ve yağ asidi metabolizması kusurları ile karışmaktadır. VPA alan hastalarda, lösin, izolösin ve valinin deamine metabolitlerinin atılımı belirgin şekilde artmaktadır (144). Bu durumun, dallı zincirli açıl-KoA dehidrogenazın inhibisyonuna bağlı olabileceğini ileri sürülmektedir. VPA alımını takiben vücutta total keton üretimi ve 3-hidroksibütirat düzeyleri de azalmakta olup, sıklıkla dikarboksilik asidüri mevcuttur ve sekonder karnitin yetmezliği de yaygındır (145-147). İdrarda serbest ve açıl-karnitin atılımı artmış olup, ve buna serbest karnitin geri emilimindeki azalma eşlik etmektedir. Bu durum karaciğer, kas ve kanda düşük karnitin düzeylerine neden olmaktadır. VPA'nın bazı minör metabolitleri, özellikle 4-en VPA, ilacın hepatotoksik etkileriyle ilişkili bulunmuştur (148). 4-en VPA'nın serbest radikal üretimine neden olarak hepatositlerde lipid peroksidasyon hasarına sebep olabileceği ve böylelikle VPA tedavisinde geri dönüşümsüz karaciğer hasarının, olası mekanizmalarından birini oluşturabileceği ileri sürülmüştür (149). Valproatın yaygın kullanımı, hepatosellüler mikroveziküler steatozla kendini gösteren ve geri dönüşümsüz karaciğer hasarı ve ölümle sonuçlanabilen, VPA'nın tetiklediği karaciğer hasarına duyarlı olan, küçük bir hasta popülasyonunu ortaya çıkarmıştır. Çoklu ilaç kullanımının bir parçası olarak VPA kullanan ve geri dönüşümsüz karaciğer hasarı ve ölümle karşılaşan hasta insidansı 2 yaş altı çocuklarda (1/500) en yüksektir (150). VPA'nın çeşitli yan etkilerinin sıklığı yaşla azalmakta ve tek başına VPA kullanan, iyi beslenmiş sağlıklı erişkilere hasar oranı 1/35.000'e kadar düşebilmektedir (147).

Valproat kullanımına bağlı gelişen, ilaç dozunun azaltılması ya da tamamen kesilmesiyle normale dönen, doza bağımlı, geri dönüşümlü anormallikler de söz konusudur. Bu ilacı kullanan hastalarda karmaşık bir organik asid paterni gözlenmiştir. Organik asidler valproil-glukuronid, metabolize edilmemiş VPA, 2-n-propilglutarat, 2-n-propilsüksinat, 3-,4-,ve 5-hidroksi-VPA ve 3-okso-VPA ve 4-okso-VPA içermektedir. Monoansatüre (4-en-VPA) ve çift ansatüre (2,4-dien-VPA) formları da saptanmıştır (151). Ayrıca VPA, 3-hidroksiizovalerat, 5-hidroksihegzanoat, 7-hidroksioktanoat, p-hidroksifenilpiruvat, dikarboksilik asidler ve daha düşük boyutta hegzanoilglisin, tiglilglisin ve izovalerilglisin atılımında artışa yol açabilir (4). VPA ve metabolitleri hiperglisinemi ve hiperglisinüriyi uyarır (152,153). VPA tedavisindeki hastalarda açıl-karnitin ve açilglisinlerin atımları artmıştır (154,155). VPA, L-karnitin ile düzeltilemeyen, kalıtsal mitokondriyal beta oksidasyon kusurlarına benzer metabolik anormalliklere neden olabilmektedir (2).

İlaç, ayrıca üre sentezini inhibe etmekte, amonyak düzeylerinde artışa neden olmaktadır (156,157). Karaciğerde işlev bozukluğu olmadığı sürece, VPA tedavisinin bu yan etkileri geri dönüşümlüdür.



Şekil 8 : Valproat meabolitlerinin atılımı olan bir olguda idrar organik asitleri (EÜTF Klinik Biyokimya B.D. arşivi)

2.3.1.2. Pivalat

Pivampisilin ve pivmesilinam yaygın reçete edilen antibiyotik öncülleri olup, hızla enzimatik olarak etkin antibiyotikleri olan ampisilin, metisilin ve ksenobiyotiksiz ilaç pivalata hidroliz olur. Pivalat esterifikasyona uğrayarak, açılarnitin olarak atılır (158). Pivampisilin kullanan hastaların idrarında, ayrıca pivaloil glisin ve pivaloil glukronid de saptanmıştır. Artmış olan açılarnitin atılımı, düşük serum karnitin düzeyleri ile birlikte sekonder karnitin yetmezliğine yol açar. Bu ilacı uzun süre kullanan hastalarda, doku düzeyleri normal kişilerin %10'u kadar olan değerlere düşebilir (159). Karnitin eksikliği olan hastaların, yağ asitlerini metabolize edebilme kapasiteleri azalır ve olgularda sıklıkla dikarboksilik asidüri de gözlenir. Pivampisilin kullanan hastaların idrarındaki pivaloilkarnitin, kütle spektrometri teknikleri ile bile izovalerilkarnitin ya da beş karbonlu açılarnitinlerden ayırd edilemez.

2.3.1.3. Etomoksir

Antidiyabetik özelliği olan etomoksir (160) gibi 2-oksirankarboksilik asidler, mitokondride uzun zincirli yağ asidi oksidasyonunu engelleyerek, çeşitli metabolik etkilere neden olurlar. Etomoksir, aç bırakılmış hayvanlarda hipoglisemik etki gösterir ve KoA esteri, CPT I düzeyinde mitokondriyal beta oksidasyonu güçlü bir şekilde inhibe eder (2). Deneysel hayvanlarda etomoksirin belirgin dikarboksilik asidüriye neden olduğu da gösterilmiştir (161). Bu dikarboksilik asidüri, mitokondriyal beta oksidasyon inhibitörleri olan, hipoglisin ya da metilen propilglisin alınımları ile oluşana benzer (162,163). Peroksizomal beta oksidasyon ise etkilenmemiştir (159).

2.3.2. Diet

2.3.2.1. Yiyecek Bileşenleri ve Toksinler

Yiyecek katkı maddeleri ve bazı doğal yiyecekler, idrara çıkarak veya sekonder metabolik etkiler üzerinden organik asidüriye neden olabilirler.

Adipik asid, jölede yaygın kullanılan bir katkı maddesidir. Bu durum, asemptomatik olan herhangi bir kalıtsal metabolizma kusuru ile ilişkisi olmayan, izole adipik asidüriye yol açabilir. Sorumlu besin ögesi diyetten çıkarıldığında organik asidüri hemen kaybolur.

Bazı olgunlaşmamış meyvelerde ve bazı tropikal meyve tohumlarında bulunan bir bitkisel toksin olan hipoglisin, kusma, şiddetli metabolik asidoz ve glikojen yetmezliğinin eşlik ettiği hipoglisemi ile karakterize Jamaikalı kusma hastalığına sebep olur. Hipoglisin, izovaleril-KoA dehidrogenazın spesifik inhibitörü olan 3,4-metilenpent-4-enoil-Koenzim A'ya dönüşür ve intoksikasyonu izovaleril-KoA dehidrogenaz eksikliğine bağlı gelişen izovalerik asidemiye benzer organik asidüriyle ilişkilidir (164). Ancak hipoglisin zehirlenmesi olan hastalardaki organik asidüri paterni, toksinin, glutarat, yağ asidi, lizin, izolösin ve valin metabolizmasıyla ilgili bir çok dehidrogenazı inhibe ettiğini düşündürmektedir (165,166).

2.3.2.2. *Oktenilsüksinat*

Oktenilsüksinik asid (1,2 –dec-4-en-dikarboksilik asid [OSA]) değiştirilmiş mısır unu formlarından birinin bileşenidir. OSA ile değiştirilen mısır unu, 30 yıldan uzun süredir puding ve soslarda kullanılmaktadır, 1987’den itibaren bebek mamalarına da dahil edilmeye başlanmıştır. Daha sonra OSA ile değiştirilmiş unla beslenen çocuklarda, OSA ve metabolitlerinin varlığına bağlı alışılmadık bir organik asid paterni gösterilmiştir (167,168). OSA, mikrozomal omega-1 ve omega oksidasyonla ve mitokondriyal ve peroksizomal beta oksidasyonlarla metabolize edilen dallı zincirli bir organik asiddir. VPA gibi OSA’nın da, oksidatif metabolizma üzerine sekonder etkileri mevcut olup, idrarda artmış glutarik asid ve 2-ketoglutarat düzeylerine neden olur. Bir çok durumda, bu atılım primer glutarik asidüri ile karışıklığa yol açabilir. VPA’nın karnitin esterleri oluşturarak, sekonder karnitin yetmezliğine yol açtığı bilinmektedir, ancak OSA’nın karnitin metabolizması üzerine benzer etkilerine dair bir kanıt bulunmamaktadır.

2.3.2.3. *MCT*

6-12 karbonlu yağ asidlerini içeren MCT (medium-chain-triglycerides), uzun zincirli trigliseridlerden farklı metabolize edilir. MCT doğrudan portal dolaşıma girer ve hidrolize olduğunda, orta zincirli yağ asidleri, karnitin açıltransferaz transport sisteminden bağımsız olarak, beta oksidasyona uğrayacakları mitokondriye girerler (169). MCT intestinal malabsorbsiyonu ve büyüme geriliği olan bebek ve çocuklarda yaygın olarak besinsel destek olarak kullanılmaktadır. MCT ile zenginleştirilmiş mamalar, idrarda yüksek düzeylerde 5-hidroksihegzonat, 7-hidroksioktonat, adipat, suberat ve sebaseat atılımı ile ilişkilidir (4,170,171). MCT ile tedavi edilen erişkin diabetik hastalarda, suberik ve 7-hidroksioktanik asid atılımı sırasıyla 55 ve 30 kat yüksek saptanmıştır (172). Yağ asidi oksidasyon kusuru sonucu olarak veya ketozis esnasında atılan dikarboksilik asidler, genellikle daha fazla adipik asid içerirken, suberik asid daha düşük , sebaseik ve 3-hidroksisebaseik asidler ise daha da düşük düzeylerde dir. MCT’den zengin diyetle beslenen hastaların idrarında ise, sebaseik asid düzeyleri özellikle yüksek iken, adipik ve suberik asidler düşüktür. Orta zincirli yağ asidlerini farklı oranlarda içeren bazı ticari mamalar, yukardakilerden farklı olarak, belirgin suberat atılımının olduğu dikarboksilik asidüriye yol açabilirler (173). MCT mamalarıyla beslenen bebek ve çocuklarda 5-hidroksihegzonat ve 7-hidroksioktonat atılımı da artmıştır. Kuhara ve

ark (174) MCT'den zengin mamalarla beslenen çocukların idrarında oktanoil glukronid varlığını bildirmişlerdir. MCT'den zengin diyet, yağ asidi oksidasyon kusurlarının tanısında karışıklığa yol açabilmektedir. MCT alan hastalarda normalin üzerinde oktanoilkarnitin ve hegzanoilkarnitin atılımı söz konusudur (154). Açıkarnitin analiz sonuçlarını doğru yorumlayabilmek için, herhangi bir tanıya varmadan önce, yakın zamanda MCT kullanım öyküsü sorgulanmalı ve göz önünde bulundurulmalıdır. MCT tedavisi almakta olan hastalarda organik asidüri sıklıkla doymuş 6-10 karbonlu dikarboksilik asidler, 5-OH-hegzanoat ve 7-OH-oktanoattan oluşur. Yağ asidi oksidasyon kusurları veya sekonder karnitin yetmezliğine bağlı gelişen dikarboksilik asidürilerde, sature ve hidroksikarboksilik asidlere ek olarak, ansature dikarboksilik asidler de bulunur. Bu bulgu, dikarboksilik asidüri nedenlerinin ayırıcı tanısında yararlı olabilir.

2.3.2.4. Vitamin Eksikliği

Diyetsel kobalaminin (vitamin B₁₂) eksikliği, metilmalonil-KoA'nın süksinil-KoA'ya metabolizmasında ve homosisteinin metiyonine dönüşümünde zorunlu bir kofaktör olup, metilmalonik asidüri ile ilişkilidir; ancak kalıtsal kobalamin metabolizması kusuru ya da mutaz mutasyonlarına bağlı metil malonik asidemideki kadar yüksek düzeylerin görülmesi enderdir (175). Vitamin B₁₂'nin diyetdeki temel kaynakları et, yumurta, süt ürünleri ve bazı mayalı yiyeceklerdir. Bu besin öğeleri, vitamin eksikliği ve metilmalonik asidüri gelişimi açısından en yüksek risk altında olan katı vejeteryanların özellikle kaçındığı gıdalardır. Vejeteryan annelerin sütü ile beslenen bebekler de kısmen risk altındadırlar (176-178). Lehotay ve Clarke, sublinik maternal vitamin B₁₂ eksikliğinden dolayı, metilmalonik asid birikimine bağlı belirgin klinik metabolik asidozu olan, anne sütü ile beslenen bir bebek tanımlamışlardır (2).

Riboflavin, yağ asidlerinin mitokondriyal beta oksidasyonu ile ilgili flavin adenin dinükleotid (FAD) bağımlı açıl-KoA dehidrogenazların, elektron transfer prostetik grubudur. Deneysel hayvanlarda besinsel riboflavin eksikliği karakteristik bir dikarboksilik asidüri ile ilişkilidir (179). Anne sütü ile beslenen ve hiperbilirubinemi nedeniyle fototerapi alan yeni doğanların riboflavin eksikliği açısından yüksek risk altında oldukları gösterilmiştir (180,181); ancak fototerapinin indüklediği riboflavin eksikliği olan, miyadında doğan yeni doğanlarda idrar organik asid atılımı normal paternler vermiştir (182). Diyetsel alım azlığı, sarılığın daha

şiddetli olması, muhtemelen daha uzun süreli fototerapi ve ultraviyole radyasyonun deriye daha fazla nüfuz ederek riboflavin yıkımından sorumlu olması nedeniyle, prematüre yeni doğanlar metabolik olarak belirgin riboflavin eksikliği için daha yüksek risk altında olabilirler. Bu problemin klinik öneminin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Ayrıca, pridoksin eksikliğinin hiperokzalüriye neden olduğu bildirilmiştir (66,67). Tiamin eksikliği ise, özellikle yüksek oranda karbonhidrat içeren TPN alan bebeklerde, şiddetli ve sıklıkla yaşamı tehdit eden laktik asidozun kanıtlanmış bir nedenidir (183).

2.3.2.5. TPN

Miyadında doğan yeni doğanlarda, kas karnitin depolarının erişkin kasındakinden belirgin derecede düşük olduğu, prematüre bebeklerde ise bu düşüklüğün çok daha belirgin olduğu gösterilmiştir (184). Karnitin içermeyen TPN'un 5 gün içinde plazma karnitin düzeylerini %50'ye kadar azalttığı gösterilmiştir (185). Karnitinsiz TPN alan 12 yaşa kadar olan çocuklar, normal plazma karnitin konsantrasyonlarını sağlayamazlar (186). Uzun süre TPN alan çocuklarda ve erişkinlerde vücut depolarını korumak için karnitin atılımı azalıyor gibi görünmektedir (187). Ancak cerrahi sonrası erken dönem (188), çoklu yaralanmaları takiben (189), sepsis, yanık sonrası (190) gibi stresin uyardığı katabolizma dönemlerinde plazma karnitin düzeyleri normalin altında olabilir. Plazma karnitin düzeyleri her zaman dokudaki depoları yansıtmaz ve dokulardaki miktar plazma düzeylerine göre beklenen değerin çok daha altında olabilir. TPN'nin uyardığı karnitin yetmezliğinin metabolik etkileri tam olarak anlaşılamamıştır. TPN ile ilişkili karnitin yetmezliğinin, organik asid bozukluğu ve dikarboksilik asidüriye yol açacak boyutta olup olmadığı ise bilinmemektedir.

2.3.3. Barsaktaki Bakteriyel Metabolizmanın Katkıları

Sağlıklı kişilerde, diyetset polissakkaridlerin bakteriyel fermentasyonu ve kalın barsağa ulaşan proteinler, kolondan hızla emilen ve karaciğerde metabolize edilen , potansiyel olarak toksik kısa zincirli yağ asitleri ve diğer düşük molekül ağırlıklı organik asidlere dönüşürler (191,192). Deneysel hayvanlarda, kısa zincirli yağ asitlerinin alımının komayı indüklemesi nedeni ile insanlardaki hepatik komanın patogenezinde de önemli olabileceği

varsayılmaktadır (193,194). Barsaktaki bakteriler, PCC eksikliğine bağlı propionik asidemi olgularında, idrardaki propiyonik asid ve metabolitlerinin ve primer metilmalonik asidüride idrardaki metilmalonik asidin önemli bir bölümünün kaynağıdır (195,196). Etkilenen hastaların metranidazol ile tedavi edilmesi, organik asid atılımında belirgin bir azalmaya neden olmaktadır (2).

Emilmemiş fenilalanin, barsak bakterileri tarafından 3-fenilpropiyonik aside (PPA) yıkılır; bu ürün karaciğerde KoA ile esterleşerek ve mitokondriyal MCAD'nin katalizlediği bir tepkime ile benzoil-KoA'ya okside olur (197). Benzoil-KoA, glisin ile kondanze olarak hızla hippurik aside çevrilir ve idrarla atılıma uğrar. PPA metabolizmasında MCAD'nin merkezi rolü, idrar açilglisinlerinin analizi ile MCAD eksikliğinin tanısında kullanılmıştır (86). İdrar 3-fenilpropiyonilglisin analizi ile MCAD eksikliğinin taranması, erken bebeklikte ya da çeşitli antibiyotiklerle tedavi edilen olgularda, barsak florasında oluşabilecek değişiklikler nedeni ile yanıltıcı sonuçlara yol açabilir (2).

Barsak tıkanıklığı ile ilişkili durumdaki hastalarda, idrarla büyük miktarlarda laktik asid atılımı ile birlikte giden şiddetli metabolik asidoza rastlanmış (131,132,198-200), bazı vakalar kalıtsal bir metabolizma kusurunu taklit eden şiddetli metabolik ensefalopati ile seyretmiştir (133,134). Bu durumdaki hastaların, plazma laktat düzeyleri normal ya biraz düşük olup, idrarla yüksek konsantrasyonda laktat atılımı beklenen bir durumdur. İdrarla aşırı laktat atılımı, bakteriyel karbonhidrat metabolizmasının bir ürünü olan ve GC-MS ile endojen L-laktattan ayıramayan D-laktat birikimine bağlıdır. GC-MS ile saptanan total laktat ve enzimatik olarak saptanan L-laktat arasındaki uyumsuzluk, bu hastalardaki bileşiklerin bakteriyel kökeni hakkında ipucu sağlar. Olguları diyet ya da antibiyotik ile tedavi edilmesi, asidozun çözülmesi ve idrarla aşırı laktat atılımının ortadan kalkmasına neden olur (2).

Akut gastroenterit, bebeklerde ve çocuklarda yaygın olarak karşılaşılan bir sağlık sorunudur. Viral gastroenteriti olan iki yeni doğanda idrarla anormal metilmalonik, etilmalonik ve 3-hidroksipropiyonik asid atılımı bildirilmiştir. Bu olgularda, tedavi sonrası ve diyarenin ortadan kalkması ile, yaşamın 12. ve 14. haftalarında tekrarlanan idrar organik asid analizleri normal saptanmış ve bebekler normal gelişimlerini göstermişlerdir. Araştırmacılar, altta yatan bir barsak hastalığı olan olgularda gözlenen anormal metabolitlerin, bakteriyel metabolizmaya bağlı olabileceğini öne sürmüşlerdir (2).

Özet olarak, D-laktat, metilmalonat, p-hidroksifenilasetat, p-hidroksifenillaktat, fenilasetilglutamin, fenilpropionilglisin, glutarat, benzoat ve hippuratın anormal atılımlarının barsaktaki bakteriyel metabolizmadan kaynaklanma olasılığı vardır (4).

2.3.4. Prematürite

33 haftadan erken doğan bebeklerin idrar organik asid paternleri, miyadında doğan bebeklerden farklıdır (201). Bu farklılık kısmen, karaciğerdeki tirozin metabolizmasının ve böbrekteki solüt geri emiliminin tam olgunlaşmamış olmasına bağlı olabilir. Barsaktaki bakteriyel metabolizma ve 4-hidroksifenilpiruvik asid dioksijenazın matüritesini tamamlamamasına bağlı olarak, erken doğan bebeklerin idrarlarında tirozin ve fenilalanin metabolitleri sıklıkla yaygın olarak bulunur. Ayrıca sağlıklı bir preterm bebeğin idrarında, yüksek düzeylerde laktat, fumarat, akonitat, süksinat, 2-hidroksiglutarat ve sitrat gibi çeşitli TCA döngüsü ara ürünlerini bulunabilir. Ek olarak daha büyük çocukların ve yetişkinlerin idrarında bulunmayan 3-hidroksi-3-metilglutarik asid gibi keton öncüllerinin atılımı da artmıştır, 3-hidroksibütirat ve asetoasetat düzeyleri ise genellikle düşük ya da yoktur. Prematüre bebeklerdeki bir çok idrar örneği adipik ve suberik asidleri içerir fakat sadece eser miktarlarda sebaseik asid içerir. Yeni doğan bebeklerdeki bu dikarboksilik asidüri paterni, enerji üretimi için artmış yağ kullanımına bağlanmıştır. Birçok sağlıklı yeni doğanın idrarında eser ya da düşük miktarlarda etilmalonik asid varlığı da gözlemlenmiştir (2,59). Az sayıda bebekte, düşük miktarlarda etilmalonik asid, 2,3-butanediol ve aseton ile birlikte metimalonik asid atılımı da söz konusudur ve barsaktaki bakteriyel karbonhidrat fermentasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir (60).

2.3.5. Böbrek Yetmezliği

Böbrek, trimetillizinden karnitin sentezinin temel yeridir. Böbrekler ayrıca vücut karnitin depolarının korunmasında da kilit rol oynarlar ve süzülen karnitin %90'ından fazlası eşiğe bağımlı olarak geri emilime uğrar. Karnitin esterlerinin renal klirensi, serbest karnitinden dört-sekiz kat daha fazla olup, açilkarnitin oluşumu ile karakterize metabolik koşullar da, idrarla artmış karnitin kaybı ile ilişkilidir. Kronik hemodiyaliz hastalarında plazma karnitin düzeyleri belirgin derecede düşüktür ve muhtemelen çok fazla serbest karnitin kaybının bir sonucu olarak, plazmada açilkarnitin esterleşmemiş karnitine oranı artmıştır. Böbreklerden

aşırı karnitin kaybına bağlı olarak sekonder karnitin yetmezliği gelişen hastaların, yağ asitlerini metabolize edebilme yetenekleri azalmış olabileceği gibi bu olgularda dikarboksilik asidüri de saptanabilir(2).

2.3.6. Doğum Asfiksisi

Çeşitli derecelerde doğum asfiksisine maruz kalan bebeklerde, olaydan hemen sonra, tahminen direk ya da dolaylı doku hipoksisine bağlı olan anormal organik asidüri paternleri tanımlanmıştır (202). Değişiklikler, idrarda belirgin derecede artmış laktik asid ve piruvik asid düzeyleri yanı sıra, 3-hidroksibütirat, tirozin metabolitleri (4-hidroksifenilpiruvat, 4-hidroksifenillaktat, 4-hidroksifeniaset) ve dallı zincirli amino asidlerin oksidatif yıkılımından elde edilen okso ve hidroksi asidlerin atılımında artışı da içerir.

2.4. ORGANİK ASİD ANALİZİ

Organik asidlerin karmaşık yapısı ve çeşitliliği, organik asidlerin kantitatif ölçümünde yöntem geliştirilmesini çok güçleştirmiş olup, günümüzde halen çok yaygın olarak kullanılmamaktadır.

1966 yılında, Tanaka ve arkadaşlarının gaz kromatografisi (GC) ve kütle spektrometre (MS) tekniğini kullanarak, lösin metabolizması ile ilgili bir kalıtsal hastalık olan izovalerik asidemiye tanımlamaları, organik asidürilerin tanısında bu yöntemin kullanıldığı ilk çalışmadır (203).

Organik asid analizinde ideal yöntem, ilgilenilen tüm organik asidlerin tek bir çalışma periyodunda saptanması ve ayrıştırılmasına olanak sağlamalıdır. İdrarda bulunabilen çok sayıda organik asid nedeniyle daha sonra, GC-MS'in beraber kullanımının, idrarda bulunması muhtemel biyolojik olarak uygun organik bileşeni saptayabilen, dinamik aralığı geniş, duyarlılık ve rezolüsyonu yeterli olan genel analitik yöntem ihtiyacına en yakın yöntem olduğu öne sürülmüştür (204). Çeşitli kalıtsal metabolik hastalıkların tanısında, ayrıca diyet ve diğer tedavi şekillerinin takibindeki klinik olarak kullanışlı olmaları nedeni ile biyolojik sıvılarda organik asid analizi için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (205-208).

Organik asidlerin vücut sıvılarında GC-MS ile analiz edilmesi öncelikle asidlerin sulu çözeltilerden bir grup olarak ekstraksiyonunu gerektirmektedir. Plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı ve vitröz sıvı organik asid analizinde örnek olarak kullanılabilir. Organik asidlerin fizyolojik sıvılardan ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Sıklıkla kullanılan bir yöntem asidifiye edilmiş idrar örneğinden türevlendirilmemiş organik asidlerin ayrılması ve dietil eter ve/veya etil asetat gibi uçucu organik solventler ile ekstrakte edilmeleridir. Tüm yöntemlerde ekstraksiyon öncesinde örneğe internal standard ilave edilmektedir. Fizyolojik sıvılardaki biyolojik önemi olan organik asidlerin gaz kromatografi işlemi sırasında hiç bir kayba uğramaması için stabil, uçucu türevlerine dönüştürülmesi gerekmektedir. Trimetilsialilasyon karboksil yanısıra hidroksil gruplarının esterleşmesi nedeni ile sıklıkla tercih edilmektedir. Rutin organik asid analizinde, işlemlerin basit olması, güvenilirlik ve maliyetin düşük olması nedeni ile sıklıkla quadropol cihazlar tercih edilmektedir. Üretici firmaların oluşturdukları organik asid kütüphaneleri ve yazılım programları organik asidlerin yorumlanmasında büyük kolaylıklar sağlamıştır. Teknik yöndeki bu gelişmeler organik asid analizini çok kolaylaştırmış, ancak yorumu çok önemli bir hale getirmiştir. Yorumda örneğin alınma zamanı, kişinin diyeti, kullandığı ilaçlar gibi birçok faktör, hastaya ilişkin öykü büyük bir önem taşımaktadır. Bir çok durumda üst üste çıkışan pikler hakkında yorum yaparken tecrübeli bir laboratuvar uzmanı kilit basamağı oluşturmaktadır. Bir tanıya varabilmek için organik asid verileri, plazma amino asid analizi, plazma ve beyin omurilik sıvısı piruvat ve laktat düzeyleri, tam kan açıl karnitin profili, kan ve diğer hücrelerde enzim aktivitesi tayini, genom analizi gibi diğer bazı analizlerle de uyumlu olmalı ve birbirini desteklemelidir (4). Bazı durumlarda, kalıtsal metabolik kusuru olmayan çocuklarda, şiddetli hastalık dönemlerinde bazı metabolitler normal sınırların üzerinde saptanabilir, bu nedenle organik asid analizinin yorumunda, hastanın klinik durumu ve rutin biyokimya tetkikleri de dikkate alınmalı ve gerekirse analiz tekrarlanmalıdır (1).

2.4.1. Preanalitik Koşullar

2.4.1.1. Örnek

Organik asid analizinde plazma, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve vitröz sıvı kullanılabilir. İdrar en kolay elde edilen ve organik asid düzeylerinin genellikle en yüksek olduğu fizyolojik sıvıdır (2). Organik asid analizi genellikle rastgele alınan spot idrar

örneklerinde çalışılır. Örnek alım zamanına ilişkin güçlü bir tavsiye bulunmamakla birlikte, daha konsantre olan sabah ilk idrarı en uygun örnek gibi görünmektedir (1,4,5). Optimal organik asid analizi için hastanın klinik durumu, diyetsetel değışiklikler ve ilaç tedavileri ile ilgili tüm bilginin doğru olarak verilmesi koşuldur (1,4). İdrar dışı vücut sıvılarında, organik asid analizinin tanısal değetine ilişkin kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Ancak idrar dışı vücut sıvılarında organik asid analizinin yararını açık olduğu bir durum, kalıtsal bir metabolizma kusuruna bağı şiddetli semptomlar sonrasında hızla ölüm görülen bir çocukta, uygun idrar örneğinin alınamamasıdır (1). Ayrıca BOS’da organik asid analizinin özellikle yararlı olduğu bazı durumlar da söz konusudur. Bunlar, serebral laktik asidemi, glutaril-KoA dehidrogenaz eksikliği gibi serebral organik asidemiler ve biotin metabolizması bozukluklarıdır. Bu olguların bir çoğunda idrar organik asid analizi normal olarak saptanmaktadır (1) .

2.4.1.2. Hasta durumu

Organik asid bozukluklarında klinik ve biyokimyasal bulguların aralığı çok geniştir. Geçerli olan iki ana klinik durum söz konusu olup, bunlar sistemik intoksikasyon ve akut ensefalopatidir. İlk epizod genelde erken bebeklikte görülür ancak daha büyük çocuklarda da ortaya çıkabilir. Daha büyük çocuklarda (sub)akut nörolojik hastalık ve ya çeşitli multisistemik dalgalanmalar şeklinde kendini gösterebilir.

Rutin klinik kimyada akut şiddetli sistemik intoksikasyon anormallikleri sıklıkla metabolik asidoz, artmış anyon açığı, sitopeni, hipoglisemi, hiperamonyemi (asidozu maskeleyebilen), laktik asidemi, trigliseridler ve serbest yağ asidlerinde yükseklikler ve ketozis gibi bulgularla kendini gösterir. Ketonüriyi test etmek, araştırmanın ilk adımı olarak kolay ve kullanışlıdır. Yağ asidi oksidasyon kusuru olan hastaların bir kısmını da içeren, organik asid bozukluğu olan yeni doğanlar ve daha büyük çocukların çoğunluğunda, belirgin ketonüri vardır. Ketonüri, metabolik hastalığı olmayan yeni doğanlarda çok nadir görülen bir bulgudur.

Daha büyük çocuklarda organik asid bozukluklarının klinik görünümü daha değışkendir. Nörolojik bulgular daha belirgindir ve genellikle temel özelliktir. Bu çocuklarda başlangıçtaki klinik görünüm, rutin biyokimya anormallikleri dikkat çekici olmayıp, gelişme geriliği ve epilepsi gibi nonspesifik bulgular söz konusu olabilir. Ayrıca tanısal metabolitlerdeki yükselme, semikantitatif rutin organik asid analizi ile atlanabilir ve ya çok düşük düzeyde olabilir. Diğer taraftan, tedavi çok başarılı ve uzun dönem sonuçları memnunkluk verici

olduğundan, bu hastalarda erken tanı büyük önem taşımaktadır. Hastalığın tedavi edilmemesi, mental retardasyon, ekstrapiramidal hareket kusurları, piramidal belirtiler, serebral atrofi ve genellikle ölümle sonuçlanır. Hastalığın nörolojik bulgularla (sub)akut seyrettiği hastaların erken tanısı, bu bozukluklar için farkındalığın artmasına bağlıdır. Klinik görünüm ataksi, miyoklonus, ekstrapiramidal semptomlar, metabolik strok ve megalensefali gibi karakteristik bulgulardan oluşur. Rutin klinik kimya verilerinin sıklıkla yardımı olmaz. Bazı sinir sistemi görüntüleme çalışmalarından önemli tanısal ipuçları elde edilebilir. İlerleyici miyelinizasyon bozukluğu, serebral atrofi, frontotemporal atrofi, hipodansiteler ve/veya bazal ganglion infarktları ve ya diğer simetrik patolojiler, bir kalıtsal metabolik hastalık düşündürürler. Hafif travmalar sonrası görülen kronik subdural effüzyonlar ya da hematomlar, glutaril-KoA dehidrogenaz eksikliğinde karakteristik bulgulardır ve çocuk istismarı belirtisi olarak yanlış yorumlanabilir (1). Organik asid analiz endikasyonları Tablo 4'te listelenmiştir.

Tablo 4: Organik asid analizi endikasyonları (1) :

• Rutin klinik kimyasal göstergeler
▪ (Açıklanamayan) metabolik asidoz ▪ Artmış anyon açığı ▪ Ağır ketozis ▪ Ketonüri ▪ Laktik asidoz ▪ Hiperammonyemi ▪ Hiperürisemi ▪ Hipertrigliseridemi ▪ Granülositopeni ve trombositopeni
• Klinik işaretler ve semptomlar
▪ Kan akrabalığı ▪ Açıklanamayan peri-prenatal öykü ▪ Sistemik intoksikasyon ○ Taşipne/asidotik nefes ○ Beslenmeyi reddetme ○ Beslenmeye bağlı ters etkiler ○ Uzamış epizodik kusma ○ Pilor stenozu (asidozla beraber) ○ Reye ya da Reye benzeri sendrom ○ Hepatosplenomegali ○ Myeloproliferatif sendrom ○ Büyüme geriliği ○ Acayip koku ○ Ani bebek ölüm sendromu ○ Ani bebek ölüm sendromu kurbanının semptomatik kardeşi ▪ Akut metabolik ensefalopati ○ Hipotoni/letarji/koma ○ Miyoklonus ○ Miyoklonik, inatçı nöbetler ○ Akut derin diskinezi ○ Pseudotümör serebri ○ Miyadında bebekte serebral/intraventriküler kanama ▪ Nörolojik bulgular ○ Progresif psikomotor gerilik

- Semptomlarda dalgalanmalar, krizler, koma
- Makrosefali
- Metabolik inme
- İlerleyen ataksi
- Hipotoni
- Distoni, atetoz
- Miyoklonus
- Miyoklonik, inatçı nöbetler
- İlerleyen periferik nöropati
- Piramidal bulgular, paraspazm, serebral palsi
- Konuşma yeteneğinin geri kalması
- Miyopati/kardiyomiyopati
- Konjenital serebral malformasyon
- Multisistemik dalgalanmalar
 - Büyüme geriliği
 - (Kronik, tekrarlayan) pankreatit
 - Hepatosplenomegali
 - Reye veya Reye benzeri sendromlar
 - Tekrarlayan şiddetli enfeksiyonlar
 - Nonimmün hemolitik anemi
 - Miyeloproliferatif sendrom
 - Hipoglisemi, metabolik asidoz, laktik asidoz, hiperammonyemi, ketonüri gibi kimyasal anormallikler

- **Nöroradyolojik ve nörofizyolojik işaretler**

- Beyaz cevher hastalığı
 - Lökodistrofi
 - Spongiform ensefalopati
 - Serebellar atrofi
 - Belirgin bazal ganglion tutulumu
 - Kalsifikasyonlar
 - Oyuklar
 - Atrofi
 - Kaudotalamik çukurda geçici germinaloid kist
 - Frontotemporal atrofi
 - Kronik subdural effüzyonlar ya da hematomlar
-

2.4.1.3. Örnek toplama

Organik asidlerin çalışılmasındaki güçlükler nedeni ile, örneğin doğru toplanması en önemli noktayı oluşturmaktadır (Tablo 5). Organik asid analizi için alınan örnekler, mümkün olan en kısa sürede dondurulmalı (-20°C), donmuş olarak taşınmalı ve çalışma zamanına kadar bu şekilde saklanmalıdır (1,4,14). Oda sıcaklığındaki kimyasal kararsızlık, okso asidler gibi bazı önemli asid gruplarının büyük oranda kaybına neden olur. Uzun süre saklanması gereken örnekler -20°C yerine -80°C 'de saklanmalıdır (1).

İdrar organik asid analizinde hatalı sonuçlara neden olabilecek bir çok durum söz konusudur. Bunlar arasında en yaygın olan, bakteriyel kontaminasyondur ve örneğin uygun şartlarda işlenmesi ile engellenebilir. Bakteriler, kendi metabolizmalarına bağlı olarak, kalıtsal metabolizma hastalıkları için karakteristik olan organik asidlerin çoğunluğunu ortadan kaldıracak, ayrıca çeşitli organik asidürileri de taklit edebilirler. Bakteriyel kaynaklı olarak en sık gözlenen anormallik laktik asid ve 2-oksoglutarik asid, süksinik asid gibi trikarboksilik asidlerde artma / azalmadır ve bu durum hatalı olarak altta yatan bir mitokondriyal hastalığın göstergesi olarak değerlendirilebilirler. Bakteriler ayrıca fenol türevlerinde de (fenol, p-krezol, hippurat) artışa yol açarlar (1,4). İdrar örneğinin dondurulmasının mümkün olmadığı koşullarda, bakteriyel gelişimi engellemek üzere, koruyucu olarak kloroform kullanılabilir (1).

Tablo 5: Örnek toplanması ve işlenmesi (1)

İdrar	:5-10 mL, koruyucusuz spot idrar, hemen dondurulmalı veya kuru buz üzerinde taşınmalıdır, dondurma imkanı yoksa koruyucu olarak bir kaç damla kloroform eklenmelidir. Zamanlı idrar örneği gereksizdir.
Plazma	:Heparinize kan hemen santrifüj edilmeli, en az 1ml plazma dondurularak, kuru buz üzerinde taşınmalıdır.
BOS	:Koruyucu eklemeyen, 1 mL'lik hacimlerde iki örnek hemen dondurulmalı ve kuru buz üzerinde taşınmaya kadar, -80°C 'de saklanmalıdır
Vitröz sıvı	:Gözün yan köşesinden en az 1 mL sıvı aspire edilmeli ve hemen dondurularak, kuru buz üzerinde taşınmalıdır.

2.4.2. Serbest Organik Asidlerin Analizi

Organik asid analizinde optimum sonuçların elde edilebilmesi için, tetkiki isteyen hekim ile laboratuvar arasında yakın bir iletişimin kurulması temel koşuldur.

2.4.2.1. Ayırıştırma (Ekstraksiyon)

Vücut sıvılarından GC-MS ile organik asit analizinde, ilk olarak asitlerin grup olarak sulu çözeltiden ayrılması gerekmektedir (1,2,4,209-211). Yıllar içinde, fizyolojik sıvılardan organik asid ekstraksiyonu ile ilgili çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. İdrarda saptanabilecek organik bileşiklerin çok sayıda olması nedeni ile, ilgili tüm bileşikleri iyi bir duyarlılıkta saptayabilen ideal bir izolasyon yöntemi kurmak zordur (209). Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan yöntem, asitlendirilmiş idrar, plazma ya da BOS'daki türevlenmemiş organik asidlerin, dietileter ve etilasetat gibi uçucu organik solventlerle eksiksiz olarak ayırıştırılmasıdır (209,210). Bazı işlemlerde asid ile ekstraksiyon öncesinde alkalen ekstraksiyonu ile amino asidlerin ortamdan uzaklaştırılması önerilmektedir. Ancak amino asid kontaminasyonuna bağlı interferans ender görülen bir sorun olup, bu işlem tanısal açıdan önemli olabilecek organik asid esterlerinin hidrolizine neden olabilir. Günümüzdeki yöntemlerin bir çoğunda, başlangıçtaki alkalen ekstraksiyonun basamağı atlanmaktadır.

Uygulanan yöntemden bağımsız olarak, farklı organik asidlerin etkin olarak ekstrakte edilmesi, birinden diğerine değişiklik gösterebilmekte olup, bu nedenle ekstraksiyon öncesinde her örneğe bir internal standard eklenmektedir. İdeal internal standard henüz tanımlanmamış olmakla birlikte, birçok laboratuvar, düşük molekül ağırlıklı, yüksek molekül ağırlıklı organik asidler ve keto asidler için olmak üzere birden fazla internal standard kullanmaktadır. Enjekte edilen örnek hacmini ve dedektör duyarlılığındaki olası değişiklikleri izlemek için örneğin enjeksiyonundan hemen önce bir eksternal standard da eklenebilmektedir (2).

2.4.2.2. Türevlendirme (Derivatizasyon)

Fizyolojik sıvılarda bulunan, biyolojik açıdan önemli organik asidlerin tümü, GC'nin girişinde ya da kolonda hiç kayba uğramadan gaz fazında çözünürlüğü izin verecek şekilde

stabil ve uçucu türevlerine dönüştürülmelidir. Minimum ihtiyaç, karboksilik asid gruplarının esterleştirilmesidir. Metilasyon, zaman içinde karboksil grupları yanısıra, hidroksil gibi diğer bazı fonksiyonel grupların da türevlenmesini sağlayan trimetilsililasyon ile yer değiştirmiştir. 2-Ketoasidlerin güvenilir bir şekilde yeniden elde edilebilmeleri, sıklıkla trimetilsializasyon öncesinde oksimlerine dönüştürülmelerini gerektirmektedir (2).

2.4.2.3. GC - MS

GC-MS, kromatografinin yüksek çözümleme gücü yanısıra, kütle spektrometresinin özgülülüğü ve duyarlılığını birleştirerek, kompleks çözeltilerdeki bileşiklerin ayrıştırılmasında kullanılan ve biyolojik sıvılardaki organik asidlerin analizinde en çok tercih edilen yöntemdir (212-216). Gaz kromatografisinde (GC), uçucu çözünmüş molekülleri içeren hareketli faz, sabit fazı içeren kolon içerisinden geçirilmekte (azot, hidrojen, helyum gibi bir taşıyıcı gaz ile) ve çözünmüş moleküller sabit fazda tutulma sürelerine göre ayrılmaktadırlar (3,212). Kütle spektrometre (MS) ise, hedef molekülü önce belli kütle/yük oranlarına göre iyonlaştıran ve bu iyonları ayırarak ölçen bir cihazdır. Organik asidler, kütle spektrumunu elde etmek için kütle/yük 50 ile kütle/yük 550 arasında olan elektron çarpıştırma (EI) kütle spektrometri tekniği ile ölçülmektedir. Tüm MS teknikleri, nötr bir atom ve ya molekülü iyonlaştıran iyonlaştırma basamağına gereksinim duyar. Yüksek vakum ve atmosferik basınca yakın koşullarda iyon oluşturmak için bir çok yöntem kullanılmaktadır. Klinik önemi olan bileşiklerin bir çoğu için, en önemli iyonlaştırma teknikleri elektron iyonlaştırma (EI) ve kimyasal iyonlaştırmadır (CI). Diğer iyonlaştırma teknikleri hızlı atom bombardımanı (FAB) ve matriks yardımcı lazer desorpsiyon iyonlaştırmadır (MALDI). Bunlara ek olarak HPLC/MS cihazlarında termospray, elektrospray, atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırma (ABCI) ara birimleri de iyonlaştırma için kullanılabilir. Kütle analizörleri ise iyonları kütle/yük oranlarına göre ayırır ve iyonların dedektöre ulaşmalarını sağlar. (3).

2.4.3. Organik Asidürilerin Araştırılmasında Kullanılan Diğer Tetkikler

2.4.3.1. Açilkarnitinlerin Analizi

Sekonder karnitin yetmezlikleri ve organik asidürilerin araştırılmasında, karnitin esterlerinin analizi, araştırmanın ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Açilkarnitinlerin ayrılması ve

miktar tayininde, teknik olarak zor ve zaman alıcı olan, kompleks organik asid karışımlarının çözömlenmesine dayanan çeşitli HPLC yöntemleri geliştirilmiştir (217,218). İdrar örneğinin rutin analizinde hızlı atom bombardımanlı (FAB) MS, hızlı ve göreceli olarak daha basit bir teknik olup, en sık kullanılan yöntemdir. Daha sonra Millington ve çalışma arkadaşları, organik asid metabolizması bozukluklarının tanısı için, plazma açilkarnitinlerinin, FAB ve tandem mass spektrometresinin bir arada kullanıldığı bir yöntem (FAB-MS-MS) ile ölçümünün daha duyarlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (6,219,220). Elektrospray iyonizasyon tandem mass spektrometre (ESI-MS/MS), aynı duyarlılıkta ancak otomasyona izin veren bir yöntem olarak geliştirilmiş, metabolik hastalık risk taramasında uygun bir noninvaziv teknik olarak öne sürölmüştür (6,221). Bu teknikler, hız, duyarlılık, doğruluk, hızlı örnek hazırlığı gibi özellikleri birlikte taşırlar, ancak pahalı ve karmaşık cihazlara gereksinim duyarlar (6).

Açilkarnitin analizi için, likid kromatografisi ve mass spektrometre (LC-MS)'de yaygın olarak kullanılmaktadır (222). Hem LC-MS hem de FAB-MS-MS göreceli olarak pahalıdır ve bir çok laboratuvar cihazların maliyetini ve gereken uzmanlık düzeyini karşılayamamaktadır. Vernez ve ark. idrarda karnitin ve açilkarnitinlerin saptanmasında bir HPLC-MS yöntemi geliştirmişler ve organik asidürlü hastaların idrarında patolojik açilkarnitin profilinin tanınmasında başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir (223).

Ölçüm duyarlılığı FAB-MS-MS ile karşılaştırılabilir düzeyde olan, GC-MS açilkarnitin analizini yapabilecek bir türevlendirme tekniğı de geliştirilmiştir. Yöntem, açilkarnitinlerin kimyasal iyonizasyon ya da elektron impakt kullanılarak GC-MS ile analiz edilen uçucu lakton yapılarına türevlendirilmesine dayanmaktadır. Örnek hazırlama göreceli olarak kolay ve hızlıdır ve analizin daha basit, etkin ve ucuz olarak, dört uçlu bir GC-MS sisteminde yapılabilmesi mümkündür (6,224-226).

2.4.3.2. Açilglisinlerin Analizi

GC-MS ile hızlı ve teknik olarak kolay açilkarnitin analiz yöntemlerinin geliştirilmesi, idrardaki organik asid değışikliklerinin aralıklarla ortaya çıkması nedeni ile tanıda zorluk çekilen yağ asidi oksidasyon kusurlarının tanısını büyük oranda kolaylaştırmıştır. Bonafe ve ark. da, mitokondriyal enerji metabolizması bozukluğu olan 26, organik asidürisi olan 55 hastada ESI-MS/MS ile idrarda açilglisin atılımını incelemişler ve bu metabolik hastalıklarda

açıl karnitin ölçümünün organik asid ve açilkarnitin profillerini tamamlayıcı bir parametre olarak, tanıda yararlı olduğunu bildirmişlerdir (227). Ancak, ölçümün duyarlılığı kritik dercede in-vivo olarak yeterli düzeyde karnitin varlığına bağlıdır. Organik asidopatilerde, karnitin tükenmesi, yaygın görülen ikincil bir metabolik sorundur ve bu olgularda açilkarnitin analizinin ölçüm duyarlılığı oldukça düşük olmak durumundadır. Bazı araştırmacılar, idrar açilkarnitin analizi öncesinde, karnitin depolarının yeterli olduğundan emin olmak için, idrar toplanmadan hemen önce, ön hazırlık olarak L-karnitin yüklemesinin önemini vurgulamaktadırlar (219). Bazı gruplar ise, çeşitli organik asidopatili hastaların idrarında atılan diğer organik asid türevlerinin tanımlanması ve saptanmasına odaklanmıştır (2).

1988'de Rinaldo ve ark.; primer yağ asidi oksidasyon kusurlarının en yaygını olan MCAD eksikliği olan hastaların idrarında, anormal açilglisin atılımını bildirmişlerdir (86) İdrarda görülen açilglisinlerin kökeni, muhtemelen kusurlu enzimin endojen substratlarının (n-hegzanoilglisin, suberilglisin) birikimi ve barsaktaki bakteriyel metabolizmadır (3-fenilpropiyoniylglisin). Açilglisin analizi teknik açıdan zor bir yöntem olup, miktar belirlenmesi için, glisin türevlerinin deuteriyumla işaretlenmiş uygun standartları kullanılmalıdır. Tedavi ile ilişkili olarak barsak flora değişiklikleri görülen ya da yaşa bağlı olarak 3-fenilpropiyonik asid üretiminin azaldığı hastalarda, yanlış negatif sonuçlar elde edilebilir (228,229). Bu nedenle bazı araştırmacılar ön aşamada ağız yolu ile 3-fenilpropiyonik asid yüklenmesini önermektedirler (89).

2.4.4. Organik Asid Analizinin Yorumu

Organik asid analizi, birçok kütle spektrometre üreticisinin yüzlerce bileşenin otomatik olarak ölçümü için, organik asid kütüphanelerini kullanması sonucunda kolaylaşmıştır. Bu gelişmelerin sonucu olarak, organik asid analizinin teknik unsurları, göreceli olarak kolaylaşmıştır. Ancak verilerin yorumu için tüm organik asid profilinin dikkate alınması, mevcut tüm spesifik organik asidlerin tanımlanması ve her birinin göreceli miktarlarının belirlenmesi gereklidir. Bu karmaşık görev, normal organik asidlerin varlığını, diyet ve ilaçlardan köken alan bileşikler ve hastaların yaşının gözönünde bulundurulmasını hesaba katan algoritmaların kullanılmasıyla kolaylaştırılmıştır. Organik asid analizi bulgularının son yorumu, hastalığın bulunduğu dönemin, ilaç maruziyetinin, diyet ve diğer değişkenler gibi,

hastanın klinik koşullarının bilinmesini gerektirdiği gibi, idrar örneğinin analiz için toplandığı zaman ve koşullara ve çevresel maruziyet öyküsüne de dikkat edilmesini gerektirir.

Otomasyon, teknik olarak ve veri işlenmesi süreci açısından, organik asid analizini belirgin ölçüde hızlandırmıştır. Ancak organik asid paterninin karmaşıklığı nedeni ile, oluşabilecek hatalara engellemek için, verilerin manuel olarak ta kontrolü gereklidir. Örneğin, günümüzdeki birçok veri sistemi, üstüste binmiş kromatografik pikleri birbirinden ayırt edebilecek güvenilirlikte ve yeterlilikte değildir. Bu nedenle, otomatik olarak alınan çıktıların deneyimli bir kullanıcı tarafından değerlendirilmesi temel koşuldur (2).

Organik asid analizinde laboratuvarların tanısai etkinliğini ve güvenilirliğini kontrol etmek için günümüzde birçok kalite kontrol programı vardır (230,231). Sağlıklı kişiler ve çeşitli kalıtsal metabolizma kusuru olan hastaların örnekleri yıl içinde, çeşitli zamanlarda katılımcı laboratuvarlara gönderilmektedir. Laboratuvarların bildirdiği analiz sonuçları ve verilerinin tanısai yorumları, referans laboratuvardan elde edilen veriler ile karşılaştırılarak değerlendirilmektedir.

2.4.5. Artefaktlar

İdrarda organik asid analizinde birçok kimyasal ve biyolojik artefaktlar tanımlanmıştır (Tablo 6). İdrar örneğinin uygunsuz koşullarda alımı ve saklanması, idrarın toplandığı kapta bulunan kimyasallar nedeni ile karışıklığa neden olabilir. Azelaik ve pimelik asidler, peroksizomal veya mitokondrial yağ asidi oksidasyon kusuru olan hastaların idrarında artmış miktarlarda bulunabilen, tek karbon sayılı dikarboksilik asidlerdir. Bu durumlarda, organik asidler primer olarak endojen kökenlidirler ve aynı zincir uzunluğundaki çift sayıda karbon atomu içeren dikarboksilik asidlerden çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Ancak her ikisi de plastiği yumuşatıcı madde içeren plastik kaplarda saklanan idrarlarda, hatalı olarak yüksek saptanabilir (232).

Organik asid atılımında yaşa bağlı farklılıklar olduğu da bilinmektedir ve bu durum böbreğin gecikmiş matürasyonu yanısıra çeşitli bileşiklerin klirens ve metabolizmasından sorumlu karaciğer ezimlerinin yeterince gelişmemiş olmasına bağlanmaktadır. Prematüre bebeklerde,

daha büyük çocuklardan farklı olarak, barsak mikroorganizmalarınca karbonhidrat fermentasyonunun bir sonucu olarak, yapay bir organik asidüri görülebilmektedir (1,60).

Tablo 6 : İdrar Organik Asid Analizinde Artefaktlar

<i>Durum</i>	<i>İlişkili organik asid (ler)</i>	<i>Değişiklik</i>
Diyet kökenli	Adipik asid	↑
	Furoik asid	↑
	Tartarik asid	↑
	N-Asetiltirozin	↑
	N-Asetiltriptofan	↑
MCT ile beslenme	Sebasik→suberik→adipik asid	↑
	7-Hidroksioktanoik asid;	↑
	oktanoilglukuronid	↑
Nutramijen ile beslenme	5-Oksoprolin	↑
Pregestimil ile beslenme	di-(2-etilheksan)fitalat	↑
İlaçlar	Sikloheksandiol	↑
I.V. Sıvılar	Propandiol	↑
L-DOPA	Vanillinlaktik asid	↑
Parasetamol (asetaminofen)	5-Oksoprolin	↑
Valproik asid	Çeşitli metabolitler (dikarboksilik asidler)	↑
Asetilsalisilik asid	2-Hidroksihippurik asid	↑
Etosüksimid	Çeşitli metabolitler	↑
Fenitoin	Çeşitli metabolitler	↑
Pirimidon	Çeşitli metabolitler	↑
Etilen glikol zehirlenmesi	Etilen glikol	↑
	Glikolik asid, okzalik asid	↑
	Benzoik asid	↑
	Hippurik asid	↓
	Glutarik asid	↑
	3-Hidroksihippionik asid	↑
	4-Hidroksifenilasetik asid	↑
	D-Laktik asid	↑
	2-Okzoglutarik asid	↑
	Fenilpropionilglisin	↑
Bakteriyel kontaminasyon	Süksinik asid	↑
	Urasil	↑
	2-Hidroksiglutarik asid	↑
	Benzoik asid	↑
	3-Hidroksibenzoik asid	↑
	4-Hidroksibenzoik asid	↑
	D-Laktik asid	↑
	Laktillaktat	↑
Kontaminasyonlar	Palmitik ve stearik asid	↑
	Gliserol	↑

Farklı iki yayında (233,234) kimyasal zehirlenmelerle bazı kalıtsal organik asid metabolizma kusurları arasındaki klinik ve analitik özelliklerin benzerliğinin yol açabileceği karışıklığa dikkat çekilmiştir. Birinci makalenin yazarları, metilmalonik asidemili bir hastanın kanında propiyonik asidin, hatalı olarak etilenglikol olarak tanımlandığını bildirmişlerdir. İkinci makalede ise, tekrarlayan metabolik asidoz öyküsü olan bir yeni doğan, başlangıçta tanımlanamayan bir kalıtsal metabolizma kusuruna olarak değerlendirilmiş, ancak daha sonra kasıtlı bir etilenglikol zehirlenmesinin kurbanı olduğu saptanmıştır. Bu örnekler, organik asidüri ve şiddetli metabolik asidozu olan hastalarda, hem kalıtsal metabolik hastalık, hem de zehirlenme olasılığını göz önünde bulundurmanın önemini vurgulamaktadır. İdrarda olağan olmayan organik asidlerin varlığı, diyetsetel bileşenler ve ilaç metabolizmasındaki genetik değışkenliğin benign bir sonucu olarak ortaya çıkabilir

3. ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu çalışmadaki olgular Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi anaokulu ve kreşindeki sağlıklı çocuklar ile Klinik Biyokimya Bilim Dalı Laboratuvarında çalışmakta olan elemanların sağlıklı çocuklarından ve ayrıca laboratuvar elemanlarından oluşturuldu. Bilinen herhangi bir sistemik ya da metabolik hastalığı bulunmayan, ilaç kullanmayan ve herhangi bir diyetssel kısıtlaması olmayan, yaşları 1-40 arasında değişen toplam 120 olgu sırası ile Grup I:1-5 yaş (n=40), Grup II:6-18 yaş (n=40), Grup III:19-40 yaş (n=40) olmak üzere üç farklı gruba ayrıldı. Çalışma hakkında bireyler, anaokulu ile kreş yönetimi ve aileler bilgilendirildi ve gönüllülük esasına dayanılarak olurları alındı.

3.2. İDRAR ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE SAKLANMASI

Yaşları 1-40 arasında değişen toplam 120 olgudan, en az 10 mL taze idrar örneği alındı. Soğuk zincir korunarak, en geç 30 dakika içinde laboratuvara ulaştırılan örneklerde kreatinin ölçümü yapıldıktan sonra, hiçbir katkı maddesi eklemeden hızla dondurularak, çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

3.3. ARAÇ-GEREÇ

GC-MS cihazı	Agilent 6890 N
Mass Selective Dedector	Agilent 5973 N
Kolon (HP 19091S-213)	HP-5MS (Crosslinked %5 PH ME Siloxane) Film Thickness:1µm, Length:30 m, Phase ratio:80, Column ID: 0.32 mm
Bilgisayar	Dell
Yazıcı	HP lazer jet 2200 D
Etüv	Memmert

Çekerocak	
Karıştırıcı	Heidolp promx 1020
Vortex	IKA MS1
Rotary Evaporator , Vakum pompası	Heidolp Laborota 4000
Otomatik pipet (20-200µL, 100-1000µL)	Eppendorf Research
Helyum gazı (%99,9)	Habaş
2 mL şişe	Agilent
Şişe kapağı	Agilent
Şişe kapağı kapatıcı (crimper)	Agilent
Şişe kapağı açıcı (decrimper)	Agilent
Ayrırma Hunisi (50 mL, cam)	Isolab
Balon (250 mL, dibi yuvarlak,cam)	Isolab
Balon (1000 mL, dibi yuvarlak,cam)	Schott Duran
Cam pastör pipeti	Isolab
Erlenmayer (50 mL)	Isolab
pH endikatör kağıdı	Merck
Tüp adaptörü (rotary evaporator için)	BOMEX
Cam tüp 24/29 şilifli (rotary evaporator için)	BOMEX
Cam pipet	Precicolor HBC

3.4. KİMSAYAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

4-Fenil butirik asid (Merck 820986) (IS)	:1 mg/mL distile su içinde taze hazırlandı
HCl (Merck 137007)	: 4M
Hidroksilamin hidroklorür (Merck 822334)	: 20mg/0.5 mL distile su içinde taze olarak hazırlandı
Sodyum klorür	: ~ 380 g NaCl distile su içinde çözülerek 1L' ye tamamlandı
Sodyum sülfat (Merck 106649)	
Etil asetat (Merck 110972)	
MSTFA(N-methyl-N-trimethylsiyl-2,2,2-trifluoroasetamide) (Sigma M-7891)	
Kloroform (Lab-scan CO7C11X)	
Distile su (HPLC grade) (Merck 115333)	

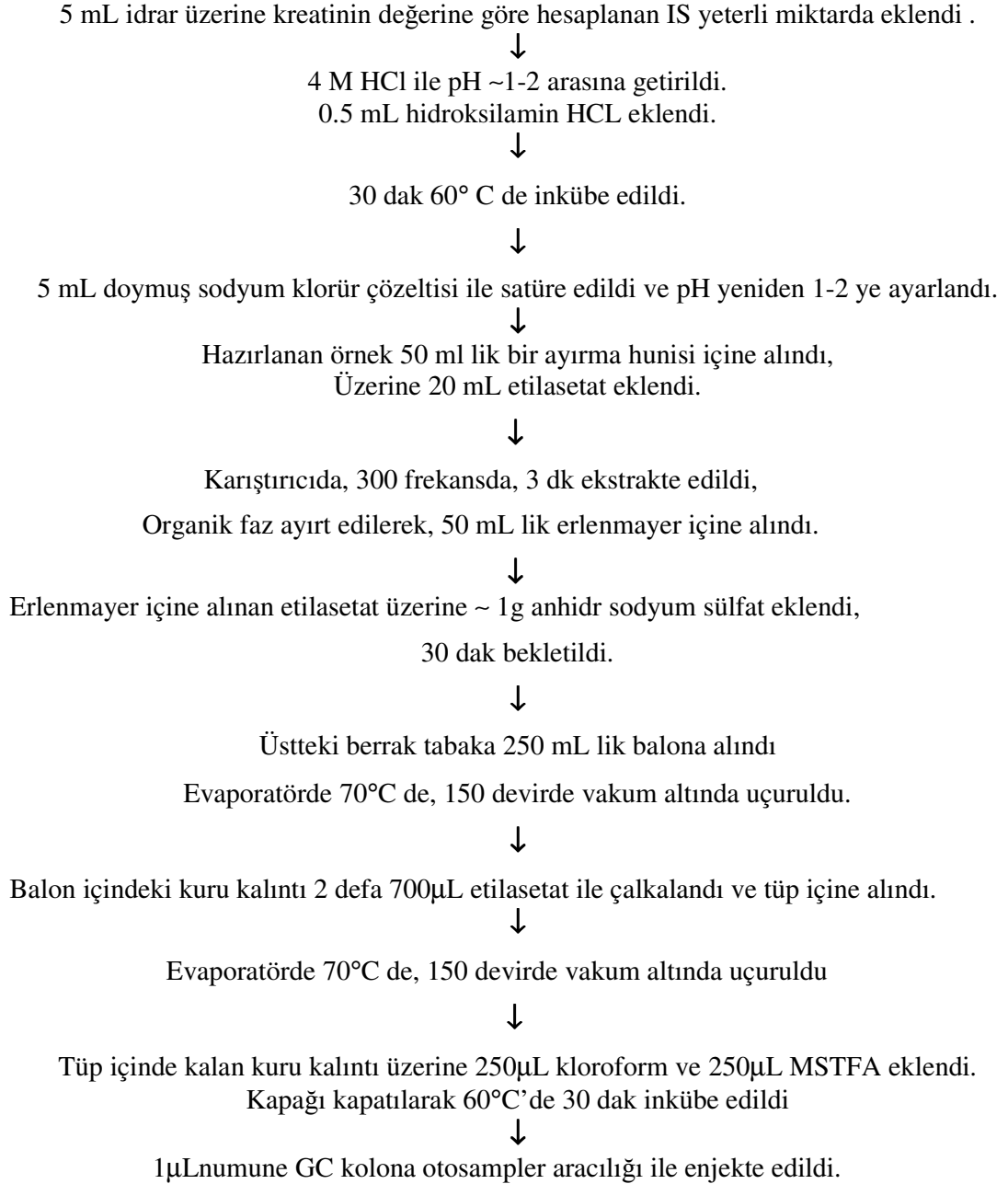
3.5. YÖNTEM

Analiz, Mills ve ark. tarafından tanımlanan yöntemin modifiye edilmesi ile uygulandı (235). Organik asidlerin idrar örneklerinden ekstraksiyonu için ilk olarak 4 M HCl ile asidifiye edilmiş idrar örneğindeki türevlendirilmemiş organik asidlerin ayrılması sağlandı ve etil asetat ile ekstrakte edildi (Tablo 7). Ekstraksiyon öncesinde örneğe kreatinin düzeyine göre hesaplanan oranlarda internal standard ilave edildi. Organik asidlerin gaz kromatografi işlemi sırasında hiç bir kayba uğramaması için stabil, uçucu türevlerine dönüştürüldü. Bu amaçla N-methyl-N-trimethylsiyl-2,2,2-trifluoroasetamide (MSTFA) kullanıldı ve trimetilsialilasyon sağlandı. Türevlendirme ve ayırma işlemlerinden sonra ekstarktlar 6890 serisi HP gaz kromatografıta, HP 5973 kütle duyarlı dedektör aracılığı ile analiz edildi. Taşıyıcı gaz olarak yüksek saflıkta helyum kullanıldı. GC-MS analizindeki koşullar ve basamaklar Tablo 8’de yer almaktadır. İdrarda kreatinin ölçümleri ise Jaffe yöntemi ile yapıldı.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler, SPSS (Statistical Packages for Social Sciences) 13.0 programı kullanılarak değerlendirildi. İlk olarak tüm parametreler için tanımlayıcı istatistik çalışması yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmada önce *Kruskal-Wallis Varyans Analizi* yapıldı. Bu testin anlamlı sonuç vermesi durumunda grupların karşılaştırılması için *Mann-Whitney U Testi* kullanıldı.

Tablo 7: Ekstraksiyon ve türevlendirme işlemi



Tablo 8 : GC-MS de analitik işlemler

GC-MS ŞARTLARI
Enjeksiyon sıcaklığı: 260°C
Enjeksiyon hacmi: 1 µL
FIRIN
Fırın sıcaklığı: 70°C-290°C
5 dk 70°C de kalacak
3°C/dk artış ile 200°C ye çıkacak
4°C/ dk artış ile 290°C ye çıkacak ve 5 dak 290°C de kalacak
Sonlanma sıcaklığı: 50°C
Çalışma süresi: 85.83 dk.
Maksimum sıcaklık : 325 °C
Denge zamanı: 0.50 dk
GİRİŞ
Mod: Splitless
Başlangıç sıcaklığı: 260°C
Basınç: 0.62 psi
Split oranı: 12:1
Split akışı: 13.4 mL/dk
Total akış: 13.4 mL/dk
Gaz tipi: Helyum
KOLON
Başlangıç akışı: 1.1 mL/dk
Mevcut başlangıç basıncı: 0.62 psi
Ortalama hız: 39 cm/sn

4. BULGULAR

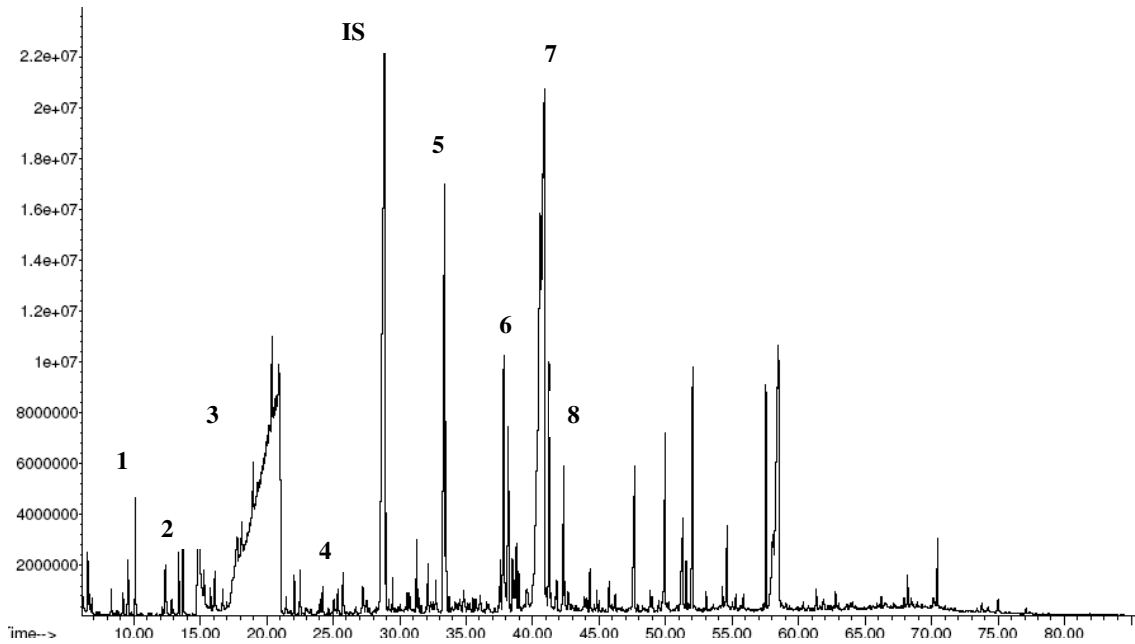
İdrarda organik asid analizi değerlendirmesinde, yaşları 1-40 arasında değişen 120 sağlıklı bireyin yaş gruplarına göre elde edilen idrar organik asid düzeylerine ilişkin tanımlayıcı istatistik çalışması, organik asidlerin ortalama değerleri ve %2.5 ve %97.5 yüzdelikleri Tablo 9'da yer almaktadır. Sağlıklı olgularda yapılan değerlendirmede gruplar arasındaki farklılık Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi ve Bonferroni düzeltmesi uygulanarak $p < 0,0167$ anlamlı olarak kabul edildi.

İdrar organik asidlerinin bir bölümü olguların %95'inden fazlasında saptanırken (suksinik asid, 4-hidroksifenilasetik asid, 2-ketoglutarik asid, hippurik asid ve sitrik asid gibi), bazı organik asidler (metilmalonik asid, izovalerilglisin, glutarik asid gibi) sadece birkaç olguda mevcuttu. Organik asidler yaş ile azalanlar, yaş ile artanlar ve yaşa bağlı değişiklik göstermeyenler olmak üzere üç kategoriye ayrıldığında:

- Yaş ile azalanlar:
 - Laktik asid, 3-hidroksiizobutirik asid ve N-asetiltirozin düzeyleri Grup I'de Grup II'ye göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,002$).
 - Piruvik asid, glutarik asid, 3-metilglutakonik asid, 3-metiladipik asid, 3-hidroksi-3-metilglutarik asid, 4-hidroksifenilasetik asid, suberik asid, akonitik asid, azelaik asid, 4-hidroksifenillaktik asid, N-asetil tirozin düzeyleri, Grup I'de Grup III'e göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p=0,006$, $p=0,002$, $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,003$, $p=0,000$, $p=0,011$, $p=0,000$, $p=0,010$, $p=0,007$, $p=0,000$).
 - Piruvik asid, metilsüksinik asid, 3-metilglutarik asid, 3-metilglutakonik asid, adipik asid, 3-metiladipik asid, 3-hidroksi-3-metilglutarik asid, 4-hidroksi fenilasetik asid, 2-ketoglutarik asid, suberik asid, akonitik asid, azelaik asid, sitrik asid, 4-hidroksifenillaktik asid, 3-hidroksisebasik asid, Grup II'de Grup III'e göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,010$, $p=0,007$, $p=0,000$, $p=0,006$, $p=0,000$, $p=0,003$, $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,002$, $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,011$, $p=0,000$, $p=0,016$).

- Yaş ile artanlar:
 - Laktik asid ve glikolik asid Grup III'de Grup II'ye göre anlamlı derecede yüksek (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$) saptandı.
 - Glikolik asid Grup III'de Grup I'e göre anlamlı yüksek saptandı ($p=0,000$).
 - 2-Metil-3-hidroksibutirik asid, metilsüksinik asid, N-asetilaspartat düzeyleri Grup II'de Grup I'e göre anlamlı derecede yüksek saptandı (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,012$, $p=0,007$) saptandı.
- Yaşa bağlı anlamlı değişiklik saptanmayanlar:
 - 3-hidroksipropiyonik asid, 4-hidroksibutirik asid, 3-hidroksibutirik asid, metilmalonik asid, 3-hidroksivalerik asid, 2-Etil-3-hidroksipropiyonik asid, 3-hidroksiizovalerik asid, etilmalonik asid, süksinik asid, urasil, fumarik asid, izovalerilglisin, mevalonik asid, tiglilisin, 2-hidroksiglutarik asid, sebasik asid, hippürik asid, izositrik asid, metilsitrik asid, 4-hidroksifenilpiruvik asid, indollaktik asidlerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı

Şekil 9'da sağlıklı bir çocuktan elde edilen, idrar organik asidlerini gösteren kromatogram örneği yer almaktadır. Türevlendirilmiş organik asidlerin retansiyon zamanları, molekül ağırlıkları ve karakteristik iyonları ise Tablo 10'da gösterilmektedir.



Şekil 9: Sağlıklı bir çocukta idrar organik asidleri (IS: internal standard, retansiyon zamanı 28.96 dk, 1: Laktik asid, 2: Piruvik asid, 3: Üre, 4: Süksinik asid, 5: Parahidroksifenilasetik asid, 6: Akonitik asid, 7: Hippürik asid, 8: Sitrik asid)

Tablo 9 : Sağlıklı bireylerde yaş gruplarına göre idrarda organik asid düzeyleri: Ortalama $\pm$ standard sapma, alt-üst sınırlar (%2,5 -%97,5 yüzdelikler) ile gruplar arası farklılıklar gösterilmektedir

Organik asid	Grup I (n=40)		Grup II (n=40)		Grup III (n=40)		Gruplar arası farklılık, p değeri
	Ortalama $\pm$ SD (mmol/mol cre)	Alt – üst sınır (mmol/mol cre) (% 2.5-% 97.5)	Ortalama $\pm$ SD (mmol/mol cre)	Alt – üst sınır (mmol/mol cre) (% 2.5-% 97.5)	Ortalama $\pm$ SD (mmol/mol cre)	Alt – üst sınır (mmol/mol cre) (% 2.5-% 97.5)	
Laktik asid	2,81 $\pm$ 4,59	0,00 – 18,89	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	1,54 $\pm$ 3,99	0,00 – 22,05	Grup I> Grup II, p=0,000 Grup III > Grup II, p=0,000
Glikolik asid	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,10 $\pm$ 0,48	0,00 – 2,37	0,93 $\pm$ 1,19	0,00 – 3,89	Grup III > Grup I, p=0,000 Grup III > Grup II, p=0,000
2-Metil-3-hidroksibutirik asid	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	1,79 $\pm$ 3,65	0,00 – 14,93	0,13 $\pm$ 0,48	0,00 – 2,57	Grup II> Grup I, p=0,000
3-hidroksipropiyonik asid	0,18 $\pm$ 0,44	0,00 – 1,73	0,17 $\pm$ 0,37	0,00 – 1,69	0,08 $\pm$ 0,18	0,00 – 0,62	
Piruvik asid	4,66 $\pm$ 1,87	0,04 – 9,43	4,90 $\pm$ 3,82	0,00 – 19,92	2,66 $\pm$ 1,27	1,07 – 6,48	Grup I > Grup III, p=0,006 Grup II> Grup III, p=0,000
4-hidroksibutirik asid	2,40 $\pm$ 3,39	0,00 – 9,97	2,63 $\pm$ 3,45	0,00 – 11,55	2,34 $\pm$ 1,13	0,00 – 5,89	
3-hidroksibutirik asid	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,14 $\pm$ 0,91	0,00 – 5,63	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	
3-hidroksiizobutirik asid	2,56 $\pm$ 3,95	0,00 – 15,7	0,20 $\pm$ 1,29	0,00 – 8,00	0,22 $\pm$ 0,91	0,00 – 4,56	Grup I > Grup II, p=0,000
Metilmalonik asid	1,60 $\pm$ 3,49	0,00 – 18,1	2,25 $\pm$ 2,50	0,00 – 8,30	0,98 $\pm$ 1,30	0,00 – 4,70	
3-hidroksivalerik asid	0,14 $\pm$ 0,92	0,00 – 5,72	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	
2-Etil-3-hidroksipropiyonik asid	0,86 $\pm$ 1,86	0,00 – 7,52	0,83 $\pm$ 1,93	0,00 – 8,95	0,26 $\pm$ 0,92	0,00 – 4,75	
3-hidroksiizovalerik asid	0,16 $\pm$ 0,75	0,00 – 4,31	0,45 $\pm$ 1,14	0,00 – 4,84	0,25 $\pm$ 0,70	0,00 – 2,81	
Etilmalonik asid	1,07 $\pm$ 3,22	0,00 – 15,00	0,17 $\pm$ 0,72	0,00 – 3,74	0,93 $\pm$ 4,48	0,00 – 27,21	
Süksinik asid	6,31 $\pm$ 8,95	0,00 – 35,80	4,51 $\pm$ 8,69	0,00 – 41,92	2,45 $\pm$ 3,93	0,00 – 21,84	
Metilsüksinik asid	0,66 $\pm$ 1,38	0,00 – 5,87	1,03 $\pm$ 1,02	0,00 – 3,39	0,44 $\pm$ 0,62	0,00 – 2,62	Grup II> Grup I, p=0,012 Grup II> Grup III, p=0,010
Urasil	0,84 $\pm$ 0,83	0,00 – 2,63	0,81 $\pm$ 0,70	0,00 – 2,32	0,47 $\pm$ 0,32	0,00 – 1,18	
Fumarik asid	0,57 $\pm$ 0,67	0,00 – 2,17	0,55 $\pm$ 0,51	0,00 – 2,06	0,25 $\pm$ 0,26	0,00 – 1,24	
Glutarik asid	1,45 $\pm$ 1,69	0,00 – 7,01	0,83 $\pm$ 0,97	0,00 – 3,18	0,36 $\pm$ 0,57	0,00 – 2,43	Grup I > Grup III, p=0,002
3-Metilglutarik asid	0,93 $\pm$ 0,97	0,00 – 4,86	0,92 $\pm$ 0,68	0,00 – 2,67	0,59 $\pm$ 0,67	0,00 – 2,62	Grup II> Grup III, p=0,007
3-Metilglutakonik asid	4,83 $\pm$ 2,11	0,00 – 8,48	4,45 $\pm$ 2,17	0,00 – 10,13	2,88 $\pm$ 2,49	0,68 – 13,79	Grup I > Grup III, p=0,000 Grup II> Grup III, p=0,000
Adipik asid	1,11 $\pm$ 2,88	0,00 – 12,44	0,90 $\pm$ 2,51	0,00 – 13,79	0,04 $\pm$ 0,29	0,00 – 1,79	Grup II> Grup III, p=0,006
3-metiladipik asid	2,55 $\pm$ 1,65	0,00 – 6,57	2,52 $\pm$ 1,64	0,00 – 6,22	1,42 $\pm$ 0,73	0,01 – 3,51	Grup I > Grup III, p=0,000 Grup II> Grup III, p=0,000

Tablo 9 (devamı): Sağlıklı bireylerde yaş gruplarına göre idrarda organik asid düzeyleri: Ortalama $\pm$ standard sapma, alt-üst sınırlar (%2,5 -%97,5 yüzdelikler) ile gruplar arası farklılıklar gösterilmektedir

Organik asid	Grup I (n=40)		Grup II (n=40)		Grup III (n=40)		Gruplar arası farklılık, p değeri
	Ortalama $\pm$ SD (mmol/mol cre)	Alt – üst sınır (mmol/mol cre) (% 2.5- %97.5)	Ortalama $\pm$ SD (mmol/mol cre)	Alt – üst sınır (mmol/mol cre) (% 2.5- %97.5)	Ortalama $\pm$ SD (mmol/mol cre)	Alt – üst sınır (mmol/mol cre) (% 2.5- %97.5)	
İzovalerilglisin	0,02 $\pm$ 0,15	0,00 – 0,94	0,02 $\pm$ 0,10	0,00 – 0,54	0,01 $\pm$ 0,06	0,00 – 0,41	
Mevalonik asid	0,02 $\pm$ 0,14	0,00 – 0,92	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	
3-hidroksi-3-metil glutarik asid	0,61 $\pm$ 1,21	0,00 – 5,89	0,39 $\pm$ 0,62	0,00 – 1,89	0,03 $\pm$ 0,13	0,00 – 0,59	Grup I > Grup III, p=0,003 Grup II> Grup III, p=0,003
Tigliglisin	0,89 $\pm$ 1,17	0,00 – 3,76	1,17 $\pm$ 1,35	0,00 – 5,52	0,42 $\pm$ 0,54	0,00 – 2,02	
2-hidroksiglutarik asid	0,02 $\pm$ 0,16	0,00 – 1,03	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,01 $\pm$ 0,07	0,00 – 0,43	
4-hidroksifenilasetik asid	35,38 $\pm$ 17,76	9,30 – 92,66	31,79 $\pm$ 27,75	0,05 – 139,07	14,01 $\pm$ 11,03	3,35 – 54,34	Grup I > Grup III, p=0,000 Grup II> Grup III, p=0,000
2-keto(okso)glutarik asid	14,78 $\pm$ 14,23	0,00 – 60,13	12,04 $\pm$ 9,55	0,00 – 49,02	4,59 $\pm$ 3,98	0,00 – 17,78	Grup II> Grup III, p=0,000
N-asetilspartat	0,10 $\pm$ 0,28	0,00 – 1,28	0,29 $\pm$ 0,37	0,00 – 1,14	0,09 $\pm$ 0,17	0,00 – 0,75	Grup II> Grup I, p=0,007
Suberik asid	2,01 $\pm$ 1,99	0,00 – 7,26	2,70 $\pm$ 2,79	0,00 – 11,63	1,03 $\pm$ 0,80	0,00 – 3,42	Grup I > Grup III, p=0,011 Grup II> Grup III, p=0,002
Sebasik asid	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,01 $\pm$ 0,08	0,00 – 0,53	
Akonitik asid	23,28 $\pm$ 12,76	0,00 – 46,38	20,25 $\pm$ 11,00	0,00 – 40,22	9,74 $\pm$ 5,27	0,12 – 28,95	Grup I > Grup III, p= 0,000 Grup II> Grup III, p= 0,000
Hippurik asid	258,78 $\pm$ 315,24	2,13 – 1831,49	209,38 $\pm$ 259,14	0,00 – 1343,89	168,39 $\pm$ 161,82	0,67 – 597, 20	
Azelaik asid	4,29 $\pm$ 6,31	0,00 – 31,77	4,76 $\pm$ 6,15	0,00 – 25,79	1,34 $\pm$ 1,97	0,00 – 8,29	Grup I > Grup III, p=0,010 Grup II> Grup III, p=0,000
Sitrik asid	33,23 $\pm$ 37,49	0,00 – 133,03	35,52 $\pm$ 36,54	0,00 – 118,65	14,43 $\pm$ 19,81	0,00 – 97,14	Grup II> Grup III, p=0,011
İzositrik asid	0,13 $\pm$ 0,86	0,00 – 5,31	0,28 $\pm$ 1,58	0,00 – 9,71	0,20 $\pm$ 0,85	0,00 – 4,16	
Metil sitrik asid	0,03 $\pm$ 0,23	0,00 – 1,43	0,12 $\pm$ 0,28	0,00 – 1,05	0,00 $\pm$ 0,04	0,00 – 0,22	
4-hidroksifenillaktik asid	2,99 $\pm$ 3,55	0,00 – 17,59	3,19 $\pm$ 2,65	0,00 – 13, 64	1,53 $\pm$ 1,87	0,00 – 10,45	Grup I > Grup III, p=0,007 Grup II> Grup III, p=0,000
4-hidroksifenilpiruvik asid	0,25 $\pm$ 0,64	0,00 – 2,92	0,09 $\pm$ 0,29	0,00 – 1,14	0,07 $\pm$ 0,16	0,00 – 0,59	
3-hidroksisebasik asid	0,66 $\pm$ 0,75	0,00 – 2,80	0,54 $\pm$ 0,55	0,00 – 1,70	0,21 $\pm$ 0,29	0,00 – 1,07	Grup II> Grup III, p=0,016
N-asetiltirozin	0,39 $\pm$ 0,68	0,00 – 2,54	0,02 $\pm$ 0,14	0,00 - ,081	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	Grup I> Grup II, p=0,002 Grup I > Grup III, p=0,000
İndollaktaktik asid	0,06 $\pm$ 0,31	0,00 – 1,71	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 – 0,00	0,01 $\pm$ 0,11	0,00 – 0,69	

Tablo 10: Türevlendirilmiş organik asidlerin retansiyon zamanları (RZ), molekül ağırlıkları (MW) ve karakteristik iyonları

<i>Organik asid</i>	<i>RZ (dk)</i>	<i>MW (amu)</i>	<i>Ölçüm ve onaylamada kullanılan karakteristik iyonlar (m/z)*</i>
Laktik asid	9.47	234	117, 147, <u>191</u> , 219
Glikolik asid	10.05	220	177 , <u>205</u>
2-Metil-3-hidroksibutirik asid	15.35	262	117 , <u>147</u>
3-hidroksipropiyonik asid	13.00	234	177 , <u>219</u>
Piruvik asid	13.42	247	147, 204, 232 , <u>247</u>
4-hidroksibutirik asid	13.75	248	<u>117</u> , <u>147</u> , 204
3-hidroksibutirik asid	13.73	248	<u>117</u> , 191 , 233
3-hidroksiizobutirik asid	13.73	248	<u>103</u> , 177 , 233
Metilmalonik asid	16.17	262-334	147, 218 , <u>247</u> - 319 , <u>83</u>
3-hidroksivalerik asid	17.55	262	<u>131</u> , 205
2-Etil-3-hidroksipropiyonik asid	16.78	262	177 , 217, 233, <u>247</u>
3-hidroksiizovalerik asid	15.82	262	<u>131</u> , 205
Etilmalonik asid	19.04	276	147, 217 , 231, <u>262</u>
Süksinik asid	20.44	262	147, <u>172</u> , 247
Metilsüksinik asid	21.00	276	<u>217</u> , 261
Urasil	21.53	256	241 , <u>255</u>
Fumarik asid	21.88	260	<u>147</u> , 245
Glutarik asid	24.37	276	<u>158</u> , 186, 204, 261
3-Metilglutarik asid	25.15	290	<u>69</u> , 204 , 275
3-Metilglutakonik asid	27.80	288	170, <u>183</u> 198 , 273
Adipik asid	28.40	290	111 , <u>217</u> , <u>275</u>
3-metiladipik asid	29.57	304	125 , 147, 173, <u>289</u>
İzovalerilglisin	29.00	231	130 , <u>145</u>
Mevalonik asid	32.41	364	233 , <u>247</u> , 259
3-hidroksi-3-metil glutarik asid	32.43	378	273 , <u>363</u>
Tigliglisin	30.82	229-301	229 , <u>214</u> - 286 , <u>184</u>
2-hidroksiglutarik asid	31.51	364	203 , <u>247</u>
4-hidroksifenilasetik asid	33.40	296	<u>179</u> , 252 , 281
2-keto(okso)glutarik asid	33.77	377	170, 260, 362 , <u>377</u>
N-asetilaspartat	35.09	391	<u>184</u> , 245, 274
Suberik asid	35.63	318	<u>169</u> , 187, 303
Sebasik asid	42.39	346	331
Akonitik asid	37.86	390	285 , <u>375</u>
Hippurik asid	40.27	251-323	105 , <u>236</u> - 105 , <u>308</u>
Azelaik asid	39.16	332	149, <u>217</u> , 317
Sitrik asid	40.58	480	183 , 211, <u>257</u>
İzositrik asid	40.54	480	<u>245</u> , 273, 319
Metil sitrik asid	41.19	494	362 , <u>479</u>
4-hidroksifenillaktik asid	42.77	398	<u>179</u> , 308
4-hidroksifenilpiruvik asid	44.21	411	204, 277 , 396
3-hidroksisebasik asid	48.02	434	217, 233, 303
N-asetiltirozin	49.54	439	179, <u>218</u> , 260
İndollaktik asid	51.02	421	202 , <u>421</u>
İnternal standard(4-fenilbutirik asid)	28.96	236	221

*Koyu renkle yazılan iyonlar kantitasyon için kullanılanlar, altı çizili olan iyonlar ise onaylamada kullanılanlardır.

5. TARTIŞMA

Kalıtsal metabolik hastalıklar (KMH), metabolik yollardaki anahtar enzimlerin sentezi ya da transmembran transporttaki temel proteinlerin sentezini düzenleyen genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak gelişen hastalıklardır. Metabolik hastalıklar tanımlandıkça, tanı ve takipte kullanılacak yöntemlere ilişkin araştırmalar da hız kazanmıştır (236).

Kalıtsal metabolik hastalıkların tanısında temel amaç, klinik önemi olan hastalıkların erken evrede saptanarak tedavi edilmesi, oluşabilecek zihinsel, bedensel sekellerin engellenmesi ve bu hastalıklardan ölüm oranının en alt düzeylere indirilmesidir. Bu hastalıkların erken dönemde saptanması, pahalı bir beslenme desteği ile birlikte, ömür boyu takip gerektirmekle birlikte, özellikle ilk 5 yaş içinde hastaneye olan acil başvurularını ve hastane masraflarını azaltmaktadır.

Organik asidüriler olarak da tanımlanan organik asidemiler, idrarda artmış organik asid atılımı ile karakterize olup, amino asid yıkım yollarındaki spesifik enzim eksikliklerinden ya da yağ ddddasidi beta oksidasyonu, karbonhidrat metabolizması ile ilgili enzim eksikliklerinden köken alırlar. Bir hastalığın organik asidüri olma olasılığının bilinmesi, tanı ve tedavi için en önemli adımdır. Letarji, tekrarlayan koma, hipotoni/hipertoni, konvülzyonlar, miyoklonus, motor-mental gerilik, ataksi gibi santral sinir sistemi ile ilgili bulgular, kusma, takipne, solunum distresi, miyopati/kardiyomiyopati, tekrarlayan enfeksiyonlar ve büyüme geriliği gibi durumlar klinisyeni uyarmalıdır (2,13). Metabolik asidoz, düşük bikarbonat düzeyleri, anyon açığında artma, amonyak düzeyinin yüksek olması, hipoglisemi, laktik asidemi, trigli,serid yüksekliği serbest yağ asidlerinde artış ketozis gibi laboratuvar verilerinin de organik asidler ile ilgili bir kusurdan kaynaklanabileceği akılda tutulmalıdır.

Kalıtsal organik asid metabolizma kusuru görülme sıklığı canlı doğumlarda 1:10.000 ile - $\geq$ 1:1.000.000 arasında değişmektedir (3). 65'ten fazla kalıtsal metabolik hastalıkta, tanı ve takip için karakteristik olan idrar organik asid paternlerinin bulunduğu bilinmektedir (4).

Düşük molekül ağırlıklı biyolojik organik asidlerin değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan analitik teknik GC-MS'tir. Organik asidlerin gaz kromatografi kütle spektrometri (GC-MS) analiz edilmesinin, amino asid ve organik asid metabolizması ile ilgili kalıtsal metabolik hastalıkların tanısında önemli bir yöntem olduğu kanıtlanmış ve son 30 yıl organik asid analizi için altın standard olarak tanımlanmıştır. Yöntem ilk olarak kalitatif ölçümler için geliştirilmiş olup, kantitatif ölçüm için geliştirilen yöntemler örnek hazırlık aşamasındaki zorluklar nedeni ile geniş bir kullanım alanı bulmamıştır. Laboratuvarlarda organik asidler sıklıkla kantite edilmemekte ya da kullanılan internal standarda göre semikantitatif olarak değerlendirilmektedir (205). İşlemdaki en önemli basamaklar 1) organik asidlerin fizyolojik sıvılardan saflaştırılması, 2) uçucu türevlerine dönüştürülmesi (metilasyon ya da trimetilsililasyon), 3) GC-MS analizidir. Kantitatif ölçümlerde, tanısal amaçlı çalışmalarda kabul edilebilir hata % 40-50 arasında iken, hastaların klinik takibi hedeflendiğinde, bu hatanın %20'nin altında olması gerektiği belirtilmektedir (237)

Organik asid analizinde kritik basamak organik asidlerin izole edilmesidir. Bu amaçla sıklıkla solvent ekstraksiyon ya da iyon değiş-tokuş kromatografi teknikleri kullanılmaktadır (213). Ancak fiziksel özelliklerindeki farklılıklar nedeni ile tüm organik asidlerde aynı şekilde iyi sonuçların elde edilmesi mümkün olmamaktadır. Solvent ekstraksiyon yönteminde 3-hidroksiizovalerat, 3-hidroksipropionat, metilsitrat ve sitrat gibi daha polar asidlerde verim daha düşük olup, ayrıca solventlerden, idrardaki nötral bileşenlerin de ekstrakte edilmesinden kaynaklanan safsızlıklar da söz konusu olabilmektedir. Anyon değiş tokuş yöntemleri ise daha güç işlemleri ve uzun süreyi gerektirmektedir. Polaritesi yüksek olan asidlerde daha iyi sonuçlar alınsa da bazı asidler sadece semikantitatif olarak ve solvent ekstraksiyondan üstün olmayacak şekilde tanımlanabilmektedir. Anyon değiş tokuş yöntemlerinin bir sakıncası da, idrar dışındaki örneklerin deproteinize edilmelerinin gerekli olması ve yüksek miktarlarda ekstrakte edilen fosfat ve sülfatların, gaz kromatografide bazı önemli organik asidleri maskeleyebilmesidir (213).

Fizyolojik sıvılardaki biyolojik önemi olan organik asidlerin gaz kromatografi işlemi sırasında hiç kayba uğramaması için stabil, uçucu türevlerine dönüştürülmesi gereklidir. Trimetilsililasyon, karboksil yanısıra hidroksil gruplarının esterleşmesi avantajı nedeni ile sıklıkla tercih edilmektedir. Bu nedenle bu çalışmada organik asidlerin trimetisilil (TMS) eterleri ölçülmüş olup, immobilize nonpolar sabit fazı oluşturan bir kapiller kolon

kullanılmıştır. TMS türevleri mono- ve di- TMS türevlerini oluşturan açığlisinler gibi bazı bileşikler için ideal olan türevlendiriciler olmamakla birlikte, bir çok organik asid için hala en kullanışlı olan türevlerdir. Açığlisinlerin daha kesin olarak belirlenebilmeleri için metil esterlerinin kullanılması daha uygundur (237).

Organik asid analizinde en önemli işlemlerden biri olan ekstraksiyon basamağında yaygın olarak etil asetat veya dietileter kullanılmaktadır. Bu çalışmada da ekstraksiyon işleminde etil asetat kullanıldı. Etilasetatın polaritesi düşük bileşiklerde (glisin konjugatları ve dikarboksilik asidler) çok iyi sonuçlar vermesine karşın, polaritesi daha yüksek olan bileşiklerde (glisolik asid ve kinürenik asid, orotik asid, kinolinik asid gibi azot içeren aromatik heterosiklik karboksi asidler) sensitivitesinin daha düşük olduğuna ilişkin bazı yayınlar bulunmaktadır (238,239). Wittman ve ark. tetrahidrofuran ekstraksiyonunu, etilasetat ekstraksiyonu ile karşılaştırdıklarında, polaritesi yüksek olan metabolitlerde tetrahidrofuranın daha duyarlı olduğunu, ancak bu verilerin tetrahidrofuranın tercih edilmesi için yeterli olmadığını bildirmişlerdir (239). Tetrahidrofuranın bir sakıncası ise, fosforik asid, hippurik asid gibi tanısız değeri olmayan bileşikleri daha yüksek düzeylerde saptamasıdır.

Bu çalışmada organik asidlerin tarama işlemi mass spektrometride m/z 50'den m/z 550'ye kadar gerçekleştirilmiş, tanımlama saf standartların analizi ile oluşturulmuş olan bir kütüphane aracılığı ile yapıldı. Çalışmadaki en önemli kısıtlılıklardan biri, aynı anda çok sayıda örneğin çalışlamaması oldu. Bir günde en fazla 18 örneğin hazırlanabilmesi ve bu örneklerin her birinin yaklaşık 90 dakika süren bir analiz süresine sahip olması nedeni ile sonuçların değerlendirilmesine kadar geçen süre, yaklaşık 2 günlük bir dönemi kapsadı. Ayrıca 3-hidroksibutirik, 3-hidroksiizobutirik asid gibi aynı pikte bulunabilen asitlerde zaman zaman yorumlamada zorluklar ile karşılaşıldı. Piklerin iç içe girmesi özellikle kısa kolonlarda karşılaşılan bir sorun olup, kolonumuzun 30 m olması nedeni ile çalışmamızda bir kaç örnek dışında bu konuda bir zorluk yaşanmadı. Bu örneklerdeki organik asidlerin seçimi karakteristik iyonları dikkate alınarak yapıldı (Tablo 10).

Son yıllarda likid kromatografi/tandem mass spektrometre (LC/MS/MS) tekniğinin kullanıma girmesi, organik asid analizinde daha hızlı analitik tekniklerin gelişimine olanak sağlamıştır. Zayıf anyon değişimli kromatografi yöntemi kullanılarak LC/MS/MS ile idrardaki bazı organik asidler hızlı ve güvenilir bir şekilde ölçülebilmektedir (206). Bu teknikte MS/MS analizi

ile ayırımı mümkün olmayan izomerlerin bir ön işlem ve LC aracığı ile birbirlerinden ayrılması mümkün olabilmektedir. Wang ve ark. da organik asid saptanmasında iyon-pair kromatografi (IPC) ve kapiller zon elektroforez (CZE) yöntemlerini karşılaştırmışlar ve CZE yönteminin net anlaşılır elektroferogram ve örnekler arası değişkenliğin üstesinden gelmedeki etkinliğinden dolayı uygun, hızlı bir tanısal araç olduğunu, idrar organik asidlerinin ölçümünde her iki yöntemle de anlamlı bir farklılık bulunmadığını belirtmişlerdir (207). Ancak söz konusu çalışmada idrardaki tüm organik asidlerin ölçümü hedeflenmemiş, sadece 6 organik asidin ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Organik asid analizinde yakın gelecekte örnek hazırlığının büyük olasılıkla otomatik hale geleceğı öngörülmektedir. Günümüzde bir çok laboratuvar, hasta örneğinin GC-MS'e enjekte edilmeye hazır hale gelmesinden önce, idrardaki organik asidlerin ekstraksiyonu ve türevlendirilmesi için, işlemlerin manuel olması nedeni ile belirgin miktarda zaman harcamaktadır. GC-MS'in örnek hazırlığının çok zaman fazla zaman ve işgücü alması gibi sorunları aşabilmek amacıyla da, daha hızlı ve kolay örnek hazırlığı yapabilen, analiz süresini kısaltan çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (239). Bu cihazların bir kısmı solvent ekstraksiyonu, solid faz ekstraksiyon (SPE) kolonlarına örneğin uygulanması, SPE kolonlarının elüsyonu, ısıtma, karıştırma, nitrojen altında uçurma, türevlendirme gibi işlemleri yapabilmektedir. İş yükünü azaltan ve zaman tasarrufu sağlayan bu özelliklere ek olarak, otomatik örnek hazırlığının diğer olumlu yönleri, daha düzenli ve tekrarlanabilir analitik sonuçlar elde edilmesi ve analiz edilmeyi bekleyen örneklerde bozulmanın daha az olmasıdır (2).

Laboratuvar verisini yalnız başına ya da tercihen klinik bilgi ile birleştirerek tanı sağlama yeteneğı olan, kural tabanlı uzman sistemlerin ya da nöral network tipi yapay zeka programlarının gelişimi henüz gerçekleşmemiştir. Bu alanda tanısal programların oluşmasına neden olacak uygulamaların gelişimi için kullanılabilecek yazılımın elde edilebilirliği, kalıtsal metabolik kusurların tanısı ile ilgilenen klinisyen ve laboratuvar uzmanlarına yardımcı olacaktır (2).

İdrarda organik asid analizinde örneklerin saklama koşulları büyük önem taşımakta olup, hemen dondurulup, -20°C'de bekletilmeleri önerilmektedir. Örneğin iyi saklanmaması tüm ketoasidlerin hidroksiasidlere dönüşümüne yol açmaktadır. Örneğin, aseto asetat 3-hidroksibutirata, 2-ketoglutarat 2-hidroksiglutarata dönüşmektedir. Diğer bir hatalı yorum

nedeni de bakteriyel metabolizmadır. Barsak enfeksiyonu gibi nedenlerle endojen kökenli olanlarda laktat, metilmalonat, p-hidroksifenilasetat, p-hidroksifenillaktat, fenilasetilglutamin, fenilpropionilglisin, glutarat, hippurat ve benzoat anormal düzeylerde atılıma uğramaktadır. İdrarda bakteri üremesi gibi ekzojen nedenlerde ise laktat, 2-ketoglutarat, 2-hidroksiglutarat, süksinat, 3-hidroksipropionat, ve fenol türevleri (fenol, p-kresol, hippurat) atılıma uğramaktadır. Biz de bakteriyel metabolizmayı en alt düzeylerde tutmak amacı ile, 24 saatlik idrar örnekleri yerine spot idrar örneklerini kullanmayı tercih ettik ve idrar örneklerini soğuk zinciri koruyarak laboratuvara ulaştırıp, analiz süresine kadar -20°C’de koruduk.

Organik asid atılımında yaşa bağlı değişkenlikler ve ölçüm için kullanılan yöntemlerdeki farklılıklar literatürde sunulan verilerin karşılaştırılmasını güçleştirmektedir. Ayrıca genetik farklılıklar ve beslenme alışkanlıkları da çeşitli çalışmalarda farklı verilerin elde edilmesine neden olabilmektedir (1,4,240). Genel olarak laboratuvarlar arasında bir karşılaştırma yapıldığında, benzer ekstraksiyon yöntemlerini kullanan laboratuvarlar olması gerekliliği vurgulanmaktadır (240).

Bu farklılıklara rağmen, sağlıklı çocuklarda saptanan organik asid değerlerinin bir çoğu literatürde verilen veriler ile uyumlu idi, ancak bazı organik asidlerde olgularımızdaki değerler daha düşük düzeylerde idi (1,3). Laktat bunlardan biri olup, idrardaki laktat atılımının yaşamın ilk yılında en yüksek düzeyde olduğu, daha sonra düştüğü ve 3-4 yaşında stabilize olduğu bildirilmektedir (241). Çalışmamızda bu bilgiler ile uyumlu olarak Grup I’deki laktat değerleri Grup III’den anlamlı derecede yüksek olmasına karşın, Grup II’deki olguların idrarında laktatın saptanamayacak düzeylerde olması nedeni ile , bu grupta Grup III’den daha düşük olarak belirlendi. Ancak genel olarak bakıldığında çalışmada elde edilen laktat değerleri literatürde sunulanlarda daha düşük değerlerde idi (1,3,4). Sitrat değerleri de literatürde verilen değerlerden daha düşük idi (1,3,4,240). Beslenme, asid-baz dengesi, hormonlar, D vitamini, kalsiyum, renal metabolitler idrardaki sitrat düzeylerini etkileyebilmektedir (242). Bu asidin idrardaki atılım düzeylerine ilişkin verilerde uyumsuzluklar da bulunmaktadır (243).

Çalışmamızda metilmalonik asid düzeyleri, diğer çalışmalardan yüksek değerlerde saptanmış olup, bu durum muhtemelen diyetssel veya metabolik B12 vitamini yetmezliğinden veya bakteriyel fermantasyondan köken almakta idi.

Yaşa bağılı değişiklikler değerlendirildiğinde, laktik asid, glikolik asid, 2-metil-3-OH-bütirik asid, metil süksinik asid, N-asetilaspartat dışında bir çok organik asidin küçük yaş gruplarında daha düşük değerlerde olduğu saptandı (Tablo 9). Bu veriler literatürde sunulan diğer veriler ile uyumlu olup, bu durum ileri yaşıta artmış kreatinin atılımının etkisine bağlı olabilir (1,240). Thompson ve ark.'da bizim sonuçlarımıza benzer şekilde glikolik asid düzeylerinin büyük yaş gruplarında daha yüksek olduğunu saptamışlardır (240). Birçok asid çift doruklu bir atılım paternine sahip olup, ara yaşlarda idrar atımları artmakta ileri yaşlarda ise orijinal düşük değerlerine dönmektedir. Kreatinin atılımındaki farklılıklar yanısıra, idrar organik asid atılımını etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Beslenme şekli yanısıra kişideki enzim düzeyleri, böbrek matüritesi bunlar arasındadır.

Erişkin kişilerdeki idrar organik asid verilerine ilişkin ise çok az sayıda kaynak bulunmakta olup, bu çalışmalardan birinde sağlıklı kişiler ile kronik yorgunluk sendromlu, depresyonu olan kişiler ve romatoid artrit hastaları karşılaştırılmıştır (244). Verilerimiz bu çalışmadaki sağlıklı kişilerde bulunan suksinik asid, 2-ketoglutarik asid, akonitik asid, adipik asid, 4-hidroksifenilasetik asid, hippurik asid düzeyleri ile yakın olmakla birlikte, olgularımızdaki laktik asid, sitrik asid, izositrik asid düzeyleri bu çalışmada elde edilenlerden daha düşük idi.

Organik asidürilerin yorumlanması, diyet ve uygulanan tedaviden etkilenmeleri ve farklı hastalıklarda aynı organik asidlerin artabilmesi nedeni ile büyük bir önem taşımaktadır. Ayrıca bazı hastalıklarda organik asidler idrarda geçici olarak ortaya çıkabilmektedir. Yorumda örneğin alınma zamanı, kişinin diyeti, kullandığı ilaçlar, karaciğer işlevleri, barsak metabolizmasındaki anormallikler, vitamin eksikliği gibi birçok faktör, hastaya ilişkin öykü büyük bir önem taşımaktadır (1,2,4). Bir çok durumda üst üste çakışan pikler hakkında yorum yaparken tecrübeli bir laboratuvar uzmanı kilit basamağı oluşturmaktadır. Asemptomatik bir hastada patolojik organik asid profili ya da semptomatik bir olguda normal bir organik asid paterni tercihan semptomatik dönemde alınacak yeni bir idrar örneği ile mutlaka tekrarlanmalıdır. Bir tanıya varabilmek için organik asid verileri, plazma amino asid analizi, plazma ve beyin omurilik sıvısı piruvat ve laktat düzeyleri, tam kan açıl karnitin profili, kan ve diğer hücrelerde enzim aktivitesi tayini, genom analizi gibi diğer bazı analizlerle de uyumlu olmalı ve birbirini desteklemelidir (1,4).

Kalıtsal hastalıklarda kullanılan tüm biyokimyasal testlerde olduğu gibi, verilerin yorumunda klinik bilgi büyük bir önem taşımaktadır. Sonuçların yorumlanması için laboratuvar uzmanı

ile klinisyenin iş birliğı temel koşuldur. Uygulanan diyet, kullanılan ilaçlar, klinik semptom ve bulgular laboratuvar uzmanının yorumda gereksinim duyduğu önemli unsurlardır. Laboratuvar uzmanı da, klinisyeni olabilecek hata kaynakları, anormal sonuçların muhtemel kökenleri, istenebilecek ileri tetkikler hakkında bilgilendirebilmelidir.

Sonuç olarak, bu çalışmada farklı yaş gruplarında organik asid düzeylerinde saptanan farklılıklar, metabolik hastalıkların tanısında yaşa bağı değerlerin kullanımının uygun olacağı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca, ülkemizdeki kalıtsal metabolik hastalık sıklığı dikkate alındığında, daha hızlı sonuç verecek, güvenilir yöntemlerin yürürlüğe konması da büyük bir önem taşımaktadır.

6. ÖZET

Kalıtsal metabolik hastalıkların bir kısmında, idrarda karakteristik organik asid atılımları söz konusudur. Bu nedenle organik asid analizi, kalıtsal metabolik hastalıkların tanı ve izleminde yararlanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, kalıtsal metabolik hastalık ön tanısı ile hastanemize başvuran ya da tanı alıp izlemi yapılan, değişik yaş gruplarındaki hastalarda ve ayrıca ebeveynlerinde idrar organik asid analizlerinin sağlıklı değerlendirilebilmesi için, yaş gruplarına göre alt ve üst düzeylerinin belirlenmesi amaçlandı.

Çalışmadaki olgular Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi anaokulu ve kreşindeki sağlıklı çocuklar ile Klinik Biyokimya Bilim Dalı laboratuvarında çalışmakta olan elemanların sağlıklı çocuklarından ve ayrıca laboratuvar elemanlarından oluşturuldu. Olgularda herhangi bir sistemik ya da metabolik hastalık ya da sürekli ilaç kullanımı söz konusu değildi. Yaşları 1-40 arasında değişen toplam 120 olgu; 1-5 yaş arası (Grup I, n=40), 6-18 yaş arası (Grup II, n=40) ve 19-40 yaş arası (Grup III, n=40) olmak üzere üç farklı gruba ayrıldı. Taze idrar örnekleri analiz süresine kadar -20° C'de saklandı. Organik asidler asidifiye edilmiş idrar örneklerinde etil asetat ile ekstrakte edildi, ardından stabil, uçucu türevlerine dönüştürüldü. Bu amaçla N-methyl-N-trimethylsiyl-2,2,2-trifluoroasetamide (MSTFA) kullanılarak trimetilsialilasyon sağlandı. Ekstraktlar gaz kromatografi kütle spektrometri (GC-MS) aracılığı ile analiz edildi. Organik asid tanımlamaları, bilgisayar ortamında kütle spektrumlarını içeren kütüphaneler aracılığı ile yapıldı. İstatistiksel analizler SPSS 13.0 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Her üç grupta, organik asidlerin alt ve üst düzeyleri, ile ortalama düzeyleri saptandı. Ayrıca yaşa göre gruplar arası farklılıklar da araştırıldı. Sonuç olarak, farklı yaş gruplarında organik asid düzeylerinde saptanan farklılıklar, metabolik hastalıkların tanısında yaşa bağlı değerlerin kullanımının uygun olacağı görüşünü desteklemektedir.

7. ABSTRACT

Urinary excretion of organic acids is known to be associated with various inborn errors of metabolism. Thus, organic acid analysis is a method utilised to diagnose and monitor inborn errors of metabolism. The aim of this study was to determine age related lower and upper limits of urinary organic acids among different age groups, as a reference study for patients admitted to our hospital with the pre-diagnosis or those under follow-up with an established diagnosis of inborn errors of metabolism and their parents.

The study group included healthy children from kinder garden and nursery of Ege University Medical School, healthy children of the employees of Clinical Biochemistry Department and the laboratory personnel. None of the subjects had a systemic or metabolic disease or was on long-term medication. Total 120 subjects age ranging between 1 and 40 were divided into three groups as follows: 1-5 years (Group I, n=40), 6-18 years (Group II, n=40) and 19-40 years (Group III, n=40). Fresh urine samples were stored under -20°C until the day of analysis. Organic acids were extracted with ethyl acetate from acidified urine samples and converted to stable volatile derivatives, in which N-methyl-N-trimethylsilyl-2,2,2-trifluoroacetamide (MSTFA) was used for trimethylsilylation. The extracts were analysed with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Organic acids were identified using computer-based libraries containing mass spectrums. SPSS 13.0 software was used in statistical analyses.

Lower and upper limits and average values of organic acids were determined for each group. Age-related differences between the groups were also investigated. In conclusion, the different values observed in different age groups support the notion that age-related values should be used in the diagnosis the metabolic disorders.

8. KAYNAKLAR

1. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. N Blau, M Duran, ME Blaskovics, KM Gibson(eds). 2nd Edition Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2003. Chapter C: Organic acid analysis. Hoffmann G., Feyh P. 27-44, Chapter E . Tandem mass spectrometry in clinical diagnosis. Millington DS. 57-75.
2. Lehotay DC, Clarke JTR. Organic acidurias and related abnormalities. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 1995; 32(4): 377-429.
3. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th. Edidition by CA Burtis, ER Aswood and DE Bruns. St. Louis MO. Elsevier Saunders 2006. Chapter 55: Rinaldo P, Hahn S, Matern D.. Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism. 2207-2247.
4. Kumps A, Duez P, Mardens Y. Metabolic, nutritional, iatrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. *Clin Chem.* 2002 May;48(5):708-17.
5. Boulat O, Gradwohl M, Matos V, Guignard JP, Bachmann C. Organic acids in the second morning urine in a healthy Swiss paediatric population. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Dec;41(12):1642-58.
6. Cyr D, Giguère R, Giguère Y, Lemieux B. Determination of urinary acylcarnitines: a complementary aid for the high-risk screening of several organic acidurias using a simple and reliable GC/MS-based method. *Clin Biochem.* 2000 Mar;33(2):151-5.
7. Stanley CA. New genetic defects in mitochondrial fatty acid oxidation and carnitine deficiency. *Adv Pediatr.* 1987;34:59-88.
8. Kim CS, O'Tuama LA, Mann JD, Roe CR. Effect of increasing carbon chain length on organic acid transport by the choroid plexus: a potential factor in Reye's syndrome. *Brain Res.* 1983 Jan 24;259(2):340-3.
9. Kim CS, Roe CR, Mann JD, Breese GR. Octanoic acid produces accumulation of monoamine acidic metabolites in the brain: interaction with organic anion transport at the choroid plexus. *J Neurochem.* 1992 Apr;58(4):1499-503.
10. Duran M, Mitchell G, de Klerk JB, de Jager JP, Hofkamp M, Bruinvis L, Ketting D, Saudubray JM, Wadman SK. Octanoic acidemia and octanoylcarnitine excretion with dicarboxylic aciduria due to defective oxidation of medium-chain fatty acids. *J Pediatr.* 1985 Sep;107(3):397-404.
11. Trauner DA. Regional cerebral Na+K+ ATPase activity following octanoate administration. *Pediatr Res.* 1980 Jun;14(6):844-5.
12. Ozand PT, Gascon GG. Organic acidurias: a review. Part 1. *J Child Neurol.* 1991 Jul;6(3):196-219.
13. Wajner M, Raymond K, Barschak A, Luft AP, Ferreira G, Domingues G, Chiochetta M, Sirtori L, Goulart L, Pulrolnik V, Pires R, Grillo E, Lohr A, Funayama C, Sanseverino MT, Longuercio-Leite JC, Coelho JC, Giugliani R, Regla-Vargas C. Detection of organic acidemias in Brazil. *Arch Med Res.* 2002 Nov-Dec;33(6):581-5.
14. Burlina AB, Bonafé L, Zacchello F. Clinical and biochemical approach to the neonate with a suspected inborn error of amino acid and organic acid metabolism. *Semin Perinatol.* 1999 Apr;23(2):162-73.
15. Ogier de Baulny H, Saudubray JM. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatol.* 2002 Feb;7(1):65-74.
16. Wolf B, Grier RE, Allen RJ, Goodman SI, Kien CL. Biotinidase deficiency: the enzymatic defect in late-onset multiple carboxylase deficiency. *Clin Chim Acta.* 1983 Jul 15;131(3):273-81.

17. Baumgartner MR, Almashanu S, Suormala T, Obie C, Cole RN, Packman S, Baumgartner ER, Valle D. The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(4):495-504.
18. Leonard JV, Seakins JW, Bartlett K, Hyde J, Wilson J, Clayton B. Inherited disorders of 3-methylcrotonyl CoA carboxylation. *Arch Dis Child.* 1981 Jan;56(1):53-9.
19. Sweetman L, Nyhan WL. Inheritable biotin-treatable disorders and associated phenomena. *Annu Rev Nutr.* 1986;6:317-43.
20. Gibson KM, Elpeleg ON, Jakobs C, Costeff H, Kelley RI. Multiple syndromes of 3-methylglutaconic aciduria. *Pediatr Neurol.* 1993 Mar-Apr;9(2):120-3.
21. Duran M, Walther FJ, Bruinvis L, Wadman SK. The urinary excretion of ethylmalonic acid: what level requires further attention? *Biochem Med.* 1983 Apr;29(2):171-5.
22. Costeff H, Elpeleg O, Apter N, Divry P, Gadoth N. 3-Methylglutaconic aciduria in "optic atrophy plus". *Ann Neurol.* 1993 Jan;33(1):103-4.
23. Costeff H, Gadoth N, Apter N, Prialnic M, Savir H. A familial syndrome of infantile optic atrophy, movement disorder, and spastic paraplegia. *Neurology.* 1989 Apr;39(4):595-7.
24. Chitayat D, Chemke J, Gibson KM, Mamer OA, Kronick JB, McGill JJ, Rosenblatt B, Sweetman L, Scriver CR. 3-Methylglutaconic aciduria: a marker for as yet unspecified disorders and the relevance of prenatal diagnosis in a 'new' type ('type 4'). *J Inherit Metab Dis.* 1992;15(2):204-12.
25. Gibson KM, Sherwood WG, Hoffman GF, Stumpf DA, Dianzani I, Schutgens RB, Barth PG, Weismann U, Bachmann C, Schrynmackers-Pitance P, et al. Phenotypic heterogeneity in the syndromes of 3-methylglutaconic aciduria. *J Pediatr.* 1991 Jun;118(6):885-90.
26. Holme E, Greter J, Jacobson CE, Larsson NG, Lindstedt S, Nilsson KO, Oldfors A, Tulinius M. Mitochondrial ATP-synthase deficiency in a child with 3-methylglutaconic aciduria. *Pediatr Res.* 1992 Dec;32(6):731-5.
27. Ibel H, Endres W, Hadorn HB, Deufel T, Paetzke I, Duran M, Kennaway NG, Gibson KM. Multiple respiratory chain abnormalities associated with hypertrophic cardiomyopathy and 3-methylglutaconic aciduria. *Eur J Pediatr.* 1993 Aug;152(8):665-70.
28. Müller-Höcker J, Ibel H, Paetzke I, Deufel T, Endres W, Kadenbach B, Gokel JM, Hübner G. Fatal infantile mitochondrial cardiomyopathy and myopathy with heterogeneous tissue expression of combined respiratory chain deficiencies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1991;419(4):355-62.
29. Lichter-Konecki U, Trefz FK, Rötig A, Munnich A, Pfeil A, Bremer HJ. 3-Methylglutaconic aciduria in a patient with Pearson syndrome. *Eur J Pediatr.* 1993 Apr;152(4):378.
30. Hammond J, Wilcken B. 3-hydroxy-3-methylglutaric, 3-methylglutaconic and 3-methylglutaric acids can be non-specific indicators of metabolic disease. *J Inherit Metab Dis.* 1984;7 Suppl 2:117-8.
31. Gibson KM, Breuer J, Nyhan WL. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur J Pediatr.* 1988 Dec;148(3):180-6.
32. Wysocki SJ, Hähnel R. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: a review. *J Inherit Metab Dis.* 1986;9(3):225-33.
33. Duran M, Ketting D, Wadman SK, Jakobs C, Schutgens RB, Veder HA. Organic acid excretion in a patient with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency: facts and artefacts. *Clin Chim Acta.* 1978 Dec 1;90(2):187-93.

34. Roe CR, Millington DS, Maltby DA. Identification of 3-methylglutaryl-carnitine. A new diagnostic metabolite of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency. *J Clin Invest.* 1986 Apr;77(4):1391-4.
35. Ugarte M, Pérez-Cerdá C, Rodríguez-Pombo P, Desviat LR, Pérez B, Richard E, Muro S, Campeau E, Ohura T, Gravel RA. Overview of mutations in the PCCA and PCCB genes causing propionic acidemia. *Hum Mutat.* 1999;14(4):275-82.
36. Gebhardt B, Dittrich S, Parbel S, Vlaho S, Matsika O, Bohles H. N-carbamylglutamate protects patients with decompensated propionic aciduria from hyperammonaemia. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(2):241-4.
37. Massoud AF, Leonard JV. Cardiomyopathy in propionic acidemia. *Eur J Pediatr.* 1993 May;152(5):441-5. Comment in: *Eur J Pediatr.* 1994 Jan;153(1):53.
38. Zhang Y, Yang YL, Hasegawa Y, Yamaguchi S, Shi CY, Song JQ, Sayami S, Liu P, Yan R, Dong JH, Qin J. Prenatal diagnosis of methylmalonic aciduria by analysis of organic acids and total homocysteine in amniotic fluid. *Chin Med J (Engl).* 2008 Feb 5;121(3):216-9.
39. Ledley FD, Crane AM, Lumetta M. Heterogeneous alleles and expression of methylmalonyl CoA mutase in mutant methylmalonic acidemia. *Am J Hum Genet.* 1990 Mar;46(3):539-47.
40. Ando T, Rasmussen K, Wright JM, Nyhan WL. Isolation and identification of methylcitrate, a major metabolic product of propionate in patients with propionic acidemia. *J Biol Chem.* 1972 Apr 10;247(7):2200-4.
41. Rosenblatt DS, Cooper BA. Inherited disorders of vitamin B12 utilization. *Bioessays.* 1990 Jul;12(7):331-4.
42. Haworth JC, Booth FA, Chudley AE, deGroot GW, Dilling LA, Goodman SI, Greenberg CR, Mallory CJ, McClarty BM, Seshia SS, et al. Phenotypic variability in glutaric aciduria type I: Report of fourteen cases in five Canadian Indian kindreds. *J Pediatr.* 1991 Jan;118(1):52-8.
43. Prats Viñas JM, Ribes Rubio MA, Briones Godino MP, Garaizar Axpe C, Sanjurjo Crespo P. [Glutaric aciduria type I]. *An Esp Pediatr.* 1993 Apr;38(4):343-7.
44. Amendt BA, Rhead WJ. 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. *J Clin Invest.* 1986 Jul;78(1):205-13.
45. Ferman FE, Goodman SI. Deficiency of electron transfer flavoprotein or electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase in glutaric acidemia type II fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Jul;82(13):4517-20.
46. Seijo-Martínez M, Navarro C, Castro del Río M, Vila O, Puig M, Ribes A, Butron M. L-2-hydroxyglutaric aciduria: clinical, neuroimaging, and neuropathological findings. *Arch Neurol.* 2005 Apr;62(4):666-70.
47. Struys EA. D-2-Hydroxyglutaric aciduria: unravelling the biochemical pathway and the genetic defect. *J Inherit Metab Dis.* 2006 Feb;29(1):21-9.
48. Rating D, Hanefeld F, Siemes H, Kneer J, Jakobs C, Hermier M, Divry P. 4-Hydroxybutyric aciduria: a new inborn error of metabolism. I. Clinical review. *J Inherit Metab Dis.* 1984;7 Suppl 1:90-2.
49. Jakobs C, Kneer J, Rating D, Hanefeld F, Divry P, Hermier M. 4-Hydroxybutyric aciduria: a new inborn error of metabolism. II. Biochemical findings. *J Inherit Metab Dis.* 1984;7 Suppl 1:92-4.
50. Gibson KM, Jansen I, Sweetman L, Nyhan WL, Rating D, Jakobs C, Divry P. 4-Hydroxybutyric aciduria: a new inborn error of metabolism. III. Enzymology and inheritance. *J Inherit Metab Dis.* 1984;7 Suppl 1:95-6.

51. Pearl PL, Novotny EJ, Acosta MT, Jakobs C, Gibson KM. Succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency in children and adults. *Ann Neurol.* 2003;54 Suppl 6:S73-80.
52. Ozand PT, Nyhan WL, al Aqeel A, Christodoulou J. Malonic aciduria. *Brain Dev.* 1994 Nov;16 Suppl:7-11.
53. Yano S, Sweetman L, Thorburn DR, Mofidi S, Williams JC. A new case of malonyl coenzyme A decarboxylase deficiency presenting with cardiomyopathy. *Eur J Pediatr.* 1997 May;156(5):382-3.
54. Sewell AC, Herwig J, Böhles H, Rinaldo P, Bhala A, Hale DE. A new case of short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency with isolated ethylmalonic aciduria. *Eur J Pediatr.* 1993 Nov;152(11):922-4.
55. Burlina AB, Dionisi-Vici C, Bennett MJ, Gibson KM, Servidei S, Bertini E, Hale DE, Schmidt-Sommerfeld E, Sabetta G, Zacchello F, et al. A new syndrome with ethylmalonic aciduria and normal fatty acid oxidation in fibroblasts. *J Pediatr.* 1994 Jan;124(1):79-86.
56. Garavaglia B, Colamaria V, Carrara F, Tonin P, Rimoldi M, Uziel G. Muscle cytochrome c oxidase deficiency in two Italian patients with ethylmalonic aciduria and peculiar clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis.* 1994;17(3):301-3.
57. Christensen E, Brandt NJ, Schmalbruch H, Kamieniecka Z, Hertz B, Ruitenbeek W. Muscle cytochrome c oxidase deficiency accompanied by a urinary organic acid pattern mimicking multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1993;16(3):553-6.
58. Lehnert W, Ruitenbeek W. Ethylmalonic aciduria associated with progressive neurological disease and partial cytochrome c oxidase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1993;16(3):557-9.
59. Duran M, Walther FJ, Bruinvis L, Wadman SK. The urinary excretion of ethylmalonic acid: what level requires further attention? *Biochem Med.* 1983 Apr;29(2):171-5.
60. Walker V, Mills GA, Hall MA, Lowes JA. Carbohydrate fermentation by gut microflora in preterm neonates. *Arch Dis Child.* 1989 Oct;64(10 Spec No):1367-73.
61. Whelan DT, Hill RE, McClorry S. Fumaric aciduria: a new organic aciduria, associated with mental retardation and speech impairment. *Clin Chim Acta.* 1983 Aug 31;132(3):301-8.
62. Kerrigan JF, Aleck KA, Tarby TJ, Bird CR, Heidenreich RA. Fumaric aciduria: clinical and imaging features. *Ann Neurol.* 2000 May;47(5):583-8.
63. Lindblad B, Lindstedt S, Steen G. On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Oct;74(10):4641-5.
64. Kvittingen EA. Hereditary tyrosinemia type I--an overview. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1986;184:27-34.
65. Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O, Strandvik B. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet.* 1992 Oct 3;340(8823):813-7.
66. Leumann E, Hoppe B. The primary hyperoxalurias. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Sep;12(9):1986-93.
67. Wandzilak TR, Williams HE. The hyperoxaluric syndromes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1990 Dec;19(4):851-67.
68. Danpure CJ. Peroxisomal alanine:glyoxylate aminotransferase and prenatal diagnosis of primary hyperoxaluria type 1. *Lancet.* 1986 Nov 15;2(8516):1168.
69. Matalon R, Michals K, Sebesta D, Deanching M, Gashkoff P, Casanova J. Aspartoacylase deficiency and N-acetylaspatic aciduria in patients with Canavan disease. *Am J Med Genet.* 1988 Feb;29(2):463-71.
70. Rhead WJ. Inborn errors of fatty acid oxidation in man. *Clin Biochem.* 1991 Aug;24(4):319-29.

71. Vianey-Liaud C, Divry P, Gregersen N, Mathieu M. The inborn errors of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Inher Metab Dis*. 1987;10 Suppl 1:159-200.
72. Hale DE, Bennett MJ. Fatty acid oxidation disorders: a new class of metabolic diseases. *J Pediatr*. 1992 Jul;121(1):1-11.
73. Jackson S, Kler RS, Bartlett K, Briggs H, Bindoff LA, Pourfarzam M, Gardner-Medwin D, Turnbull DM. Combined enzyme defect of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*. 1992 Oct;90(4):1219-25.
74. Tolwani RJ, Hamm DA, Tian L, Sharer JD, Vockley J, Rinaldo P, Matern D, Schoeb TR, Wood PA. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in gene-targeted mice. *PLoS Genet*. 2005 Aug;1(2):e23. Epub 2005 Aug 19.
75. Stanley CA, Hale DE, Coates PM, Hall CL, Corkey BE, Yang W, Kelley RI, Gonzales EL, Williamson JR, Baker L. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in children with non-ketotic hypoglycemia and low carnitine levels. *Pediatr Res*. 1983 Nov;17(11):877-84.
76. Taubman B, Hale DE, Kelley RI. Familial Reye-like syndrome: a presentation of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatrics*. 1987 Mar;79(3):382-5.
77. Touma EH, Charpentier C. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child*. 1992 Jan;67(1):142-5.
78. Treem WR, Witzleben CA, Piccoli DA, Stanley CA, Hale DE, Coates PM, Watkins JB. Medium-chain and long-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency: clinical, pathologic and ultrastructural differentiation from Reye's syndrome. *Hepatology*. 1986 Nov-Dec;6(6):1270-8.
79. Harpey JP, Charpentier C, Paturneau-Jouas M. Sudden infant death syndrome and inherited disorders of fatty acid beta-oxidation. *Biol Neonate*. 1990;58 Suppl 1:70-80.
80. Howat AJ, Bennett MJ, Variend S, Shaw L, Engel PC. Defects of metabolism of fatty acids in the sudden infant death syndrome. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985 Jun 15;290(6484):1771-3.
81. Pollitt RJ. Defects in mitochondrial fatty acid oxidation: clinical presentations and their role in sudden infant death. *Pediatr Padol*. 1993;28(1):13-7.
82. Greene CL, Blitzler MG, Shapira E. Inborn errors of metabolism and Reye syndrome: differential diagnosis. *J Pediatr*. 1988 Jul;113(1 Pt 1):156-9.
83. Duran M, Hofkamp M, Rhead WJ, Saudubray JM, Wadman SK. Sudden child death and 'healthy' affected family members with medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Pediatrics*. 1986 Dec;78(6):1052-7.
84. Gregersen N, Kølvrå S, Rasmussen K, Mortensen PB, Divry P, David M, Hobolth N. General (medium-chain) acyl-CoA dehydrogenase deficiency (non-ketotic dicarboxylic aciduria): quantitative urinary excretion pattern of 23 biologically significant organic acids in three cases. *Clin Chim Acta*. 1983 Aug 15;132(2):181-91.
85. Duran M, Wadman SK. Chemical diagnosis of inherited defects of fatty acid metabolism and ketogenesis. *Enzyme*. 1987;38(1-4):115-23.
86. Rinaldo P, O'Shea JJ, Coates PM, Hale DE, Stanley CA, Tanaka K. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. Diagnosis by stable-isotope dilution measurement of urinary n-hexanoylglycine and 3-phenylpropionylglycine. *N Engl J Med*. 1988 Nov 17;319(20):1308-13.
87. Rinaldo P, O'Shea JJ, Goodman SI, Miller LV, Fennessey PV, Whelan DT, Hill RE, Tanaka K. Comparison of urinary acylglycines and acylcarnitines as diagnostic markers of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 1989;12 Suppl 2:325-8.
88. Sweetman L, Hoffmann G, Aramaki S. New diagnostic techniques for the detection of organic acidemias. *Enzyme*. 1987;38(1-4):124-31.

89. Rumsby G, Seakins JW, Leonard JV. A simple screening test for medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 1986 Aug 23;2(8504):467.
90. Duran M, Bruinvis L, Ketting D, de Klerk JB, Wadman SK. Cis-4-decenoic acid in plasma: a characteristic metabolite in medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin Chem*. 1988 Mar;34(3):548-51.
91. Morton DH, Kelley RI. Diagnosis of medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency in the neonatal period by measurement of medium-chain fatty acids in plasma and filter paper blood samples. *J Pediatr*. 1990 Sep;117(3):439-42.
92. Heales SJ, Woolf DA, Robinson P, Leonard JV. Rapid diagnosis of medium-chain acyl CoA dehydrogenase deficiency by measurement of cis-4-decenoic acid in plasma. *J Inherit Metab Dis*. 1991;14(5):661-7.
93. Heales SJ, Leonard JV. Diagnosis of medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency by measurement of cis-4-decenoic acid in dried blood spots. *Clin Chim Acta*. 1992 Jul 31;209(1-2):61-6.
94. Bennett MJ, Ragni MC, Ostfeld RJ, Santer R, Schmidt-Sommerfeld E. Population screening for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: analysis of medium-chain fatty acids and acylglycines in blood spots. *Ann Clin Biochem*. 1994 Jan;31 (Pt 1):72-7.
95. Gregersen N, Andresen BS, Bross P, Winter V, Rüdiger N, Engst S, Christensen E, Kelly D, Strauss AW, Kølvråa S, et al. Molecular characterization of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: identification of a lys329 to glu mutation in the MCAD gene, and expression of inactive mutant enzyme protein in *E. coli*. *Hum Genet*. 1991 Apr;86(6):545-51.
96. Curtis D, Blakemore AI, Engel PC, Kolvraa S, Gregersen N, Pollitt RJ. Medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in the United Kingdom. *Prog Clin Biol Res*. 1992;375:489-94.
97. Kølvråa S, Gregersen N, Blakemore AI, Schneidermann AK, Winter V, Andresen BS, Curtis D, Engel PC, Pricille D, Rhead W, et al. The most common mutation causing medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency is strongly associated with a particular haplotype in the region of the gene. *Hum Genet*. 1991 Aug;87(4):425-8.
98. Lundemose JB, Gregersen N, Kølvråa S, Nørgaard Pedersen B, Gregersen M, Helweg-Larsen K, Simonsen J. The frequency of a disease-causing point mutation in the gene coding for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr*. 1993 Jun-Jul;82(6-7):544-6.
99. Matsubara Y, Narisawa K, Tada K, Ikeda H, Yeqi Y, Danks DM, Green A, McCabe ER. Prevalence of K329E mutation in the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene determined from Guthrie cards. *Prog Clin Biol Res*. 1992;375:453-62.
100. Hale DE, Stanley CA, Coates PM. The long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Prog Clin Biol Res*. 1990;321:303-11.
101. Hale DE, Batshaw ML, Coates PM, Frerman FE, Goodman SI, Singh I, Stanley CA. Long-chain acyl coenzyme A dehydrogenase deficiency: an inherited cause of nonketotic hypoglycemia. *Pediatr Res*. 1985 Jul;19(7):666-71.
102. Treem WR, Stanley CA, Hale DE, Leopold HB, Hyams JS. Hypoglycemia, hypotonia, and cardiomyopathy: the evolving clinical picture of long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatrics*. 1991 Mar;87(3):328-33.
103. Amendt BA, Greene C, Sweetman L, Cloherty J, Shih V, Moon A, Teel L, Rhead WJ. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. Clinical and biochemical studies in two patients. *J Clin Invest*. 1987 May;79(5):1303-9.
104. Coates PM, Hale DE, Finocchiaro G, Tanaka K, Winter SC. Genetic deficiency of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase in cultured fibroblasts from a patient

- with muscle carnitine deficiency and severe skeletal muscle weakness. *J Clin Invest.* 1988 Jan;81(1):171-5.
105. Hoffmann GF, Hunneman DH, Jakobs C, Wilichowski E, Eber SW, Hanefeld F, Rating D, Reichmann H. Progressive fatal pancytopenia, psychomotor retardation and muscle carnitine deficiency in a child with ethylmalonic aciduria and ethylmalonic acidemia. *J Inher Metab Dis.* 1990;13(3):337-40.
 106. Turnbull DM, Bartlett K, Stevens DL, Alberti KG, Gibson GJ, Johnson MA, McCulloch AJ, Sherratt HS. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with a lipid-storage myopathy and secondary carnitine deficiency. *N Engl J Med.* 1984 Nov 8;311(19):1232-6.
 107. Carpenter K, Pollitt RJ, Middleton B. Human liver long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Mar 16;183(2):443-8.
 108. Uchida Y, Izai K, Orii T, Hashimoto T. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J Biol Chem.* 1992 Jan 15;267(2):1034-41.
 109. Duran M, Wanders RJ, de Jager JP, Dorland L, Bruinvis L, Ketting D, IJlst L, van Sprang FJ. 3-Hydroxydicarboxylic aciduria due to long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency associated with sudden neonatal death: protective effect of medium-chain triglyceride treatment. *Eur J Pediatr.* 1991 Jan;150(3):190-5.
 110. Hagenfeldt L, von Döbeln U, Holme E, Alm J, Brandberg G, Enocksson E, Lindeberg L. 3-Hydroxydicarboxylic aciduria--a fatty acid oxidation defect with severe prognosis. *J Pediatr.* 1990 Mar;116(3):387-92.
 111. Glasgow AM, Engel AG, Bier DM, Perry LW, Dickie M, Todaro J, Brown BI, Utter MF. Hypoglycemia, hepatic dysfunction, muscle weakness, cardiomyopathy, free carnitine deficiency and long-chain acylcarnitine excess responsive to medium chain triglyceride diet. *Pediatr Res.* 1983 May;17(5):319-26.
 112. Jackson S, Bartlett K, Land J, Moxon ER, Pollitt RJ, Leonard JV, Turnbull DM. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Pediatr Res.* 1991 Apr;29(4 Pt 1):406-11.
 113. den Boer ME, Wanders RJ, Morris AA, IJlst L, Heymans HS, Wijburg FA. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: clinical presentation and follow-up of 50 patients. *Pediatrics.* 2002 Jan;109(1):99-104.
 114. Pollitt RJ. Clinical and biochemical presentations in 20 cases of hydroxydicarboxylic aciduria. *Prog Clin Biol Res.* 1990;321:495-502.
 115. Wanders RJ, IJlst L, van Gennip AH, Jakobs C, de Jager JP, Dorland L, van Sprang FJ, Duran M. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: identification of a new inborn error of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *J Inher Metab Dis.* 1990;13(3):311-4.
 116. Rocchiccioli F, Wanders RJ, Aubourg P, Vianey-Liaud C, IJlst L, Fabre M, Cartier N, Bougnères PF. Deficiency of long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: a cause of lethal myopathy and cardiomyopathy in early childhood. *Pediatr Res.* 1990 Dec;28(6):657-62.
 117. Vici CD, Burlina AB, Bertini E, Bachmann C, Mazziotta MR, Zacchello F, Sabetta G, Hale DE. Progressive neuropathy and recurrent myoglobinuria in a child with long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr.* 1991 May;118(5):744-6.

118. Jackson S, Kler RS, Bartlett K, Briggs H, Bindoff LA, Pourfarzam M, Gardner-Medwin D, Turnbull DM. Combined enzyme defect of mitochondrial fatty acid oxidation. *J Clin Invest*. 1992 Oct;90(4):1219-25.
119. Treem WR, Rinaldo P, Hale DE, Stanley CA, Millington DS, Hyams JS, Jackson S, Turnbull DM. Acute fatty liver of pregnancy and long-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Hepatology*. 1994 Feb;19(2):339-45.
120. Wilcken B, Leung KC, Hammond J, Kamath R, Leonard JV. Pregnancy and fetal long-chain 3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Lancet*. 1993 Feb 13;341(8842):407-8.
121. Tein I, De Vivo DC, Hale DE, Clarke JT, Zinman H, Laxer R, Shore A, DiMauro S. Short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in muscle: a new cause for recurrent myoglobinuria and encephalopathy. *Ann Neurol*. 1991 Sep;30(3):415-9.
122. Bergoffen J, Kaplan P, Hale DE, Bennett MJ, Berry GT. Marked elevation of urinary 3-hydroxydecanedioic acid in a malnourished infant with glycogen storage disease, mimicking long-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1993;16(5):851-6.
123. Bennett MJ, Weinberger MJ, Sherwood WG, Burlina AB. Secondary 3-hydroxydicarboxylic aciduria mimicking long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1994;17(3):283-6.
124. Giardini O, Cantani A, Kennaway NG, D'Eufemia P. Chronic tyrosinemia associated with 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase deficiency with acute intermittent ataxia and without visceral and bone involvement. *Pediatr Res*. 1983 Jan;17(1):25-9.
125. Endo F, Kitano A, Uehara I, Nagata N, Matsuda I, Shinka T, Kuhara T, Matsumoto I. Four-hydroxyphenylpyruvic acid oxidase deficiency with normal fumarylacetoacetase: a new variant form of hereditary hypertyrosinemia. *Pediatr Res*. 1983 Feb;17(2):92-6.
126. Tada K, Yokoyama Y, Nakagawa H, Yoshida T, Arakawa T. Vitamin B6 dependent xanthurenic aciduria. *Tohoku J Exp Med*. 1967 Oct;93(2):115-24.
127. Komrower GM, Wilson V, Clamp JR, Westall RG. Hydroxykynureninuria: a case of abnormal tryptophan metabolism probably due to a deficiency of kynureninase. *Arch Dis Child*. 1964 Jun;39:250-6.
128. Teyssier G, Rayet I, Martin O, Damon G, Frappaz D. [Carbohydrate infusion inducing lactic acidosis. Role of thiamine deficiency in an infant with malnutrition] *Presse Med*. 1986 Jan 25;15(3):120-1.
129. Stacpoole PW. Lactic acidosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1993 Jun;22(2):221-45.
130. Pettersen JE, Landaas S, Eldjarn L. The occurrence of 2-hydroxybutyric acid in urine from patients with lactic acidosis. *Clin Chim Acta*. 1973 Oct 12;48(2):213-9.
131. Mason PD. Metabolic acidosis due to D-lactate. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Apr 26;292(6528):1105-6.
132. Hudson M, Pocknee R, Mowat NA. D-lactic acidosis in short bowel syndrome--an examination of possible mechanisms. *Q J Med*. 1990 Feb;74(274):157-63.
133. Gurevitch J, Sela B, Jonas A, Golan H, Yahav Y, Passwell JH. D-lactic acidosis: a treatable encephalopathy in pediatric patients. *Acta Paediatr*. 1993 Jan;82(1):119-21.
134. Thurn JR, Pierpont GL, Ludvigsen CW, Eckfeldt JH. D-lactate encephalopathy. *Am J Med*. 1985 Dec;79(6):717-21.
135. Wellner VP, Sekura R, Meister A, Larsson A. Glutathione synthetase deficiency, an inborn error of metabolism involving the gamma-glutamyl cycle in patients with 5-oxoprolinuria (pyroglutamic aciduria). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Jun;71(6):2505-9.

136. Pitt JJ, Brown GK, Clift V, Christodoulou J. Atypical pyroglutamic aciduria: possible role of paracetamol. *J Inher Metab Dis*. 1990;13(5):755-6.
137. Bonham JR, Rattenbury JM, Meeks A, Pollitt RJ. Pyroglutamic aciduria from vigabatrin. *Lancet*. 1989 Jun 24;1(8652):1452-3.
138. Hoffmann GF, Charpentier C, Mayatepek E, Mancini J, Leichenring M, Gibson KM, Divry P, Hrebicek M, Lehnert W, Sartor K, et al. Clinical and biochemical phenotype in 11 patients with mevalonic aciduria. *Pediatrics*. 1993 May;91(5):915-21.
139. Niederwieser A, Wadman SK, Danks DM. Excretion of cis- and trans-4-hydroxycyclohexylacetic acid in addition to hawkinsin in a family with a postulated defect of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Clin Chim Acta*. 1978 Dec 1;90(2):195-200.
140. Wilcken B, Hammond JW, Howard N, Bohane T, Hocart C, Halpern B. Hawkinsinuria: a dominantly inherited defect of tyrosine metabolism with severe effects in infancy. *N Engl J Med*. 1981 Oct 8;305(15):865-8.
141. Cotariu D, Zaidman JL. Valproic acid and the liver. *Clin Chem*. 1988 May;34(5):890-7.
142. Becker CM, Harris RA. Influence of valproic acid on hepatic carbohydrate and lipid metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 1983 Jun;223(2):381-92.
143. Abbott FS, Kassam J, Orr JM, Farrell K. The effect of aspirin on valproic acid metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 1986 Jul;40(1):94-100.
144. Anderson GD, Acheampong AA, Levy RH. Interaction between valproate and branched-chain amino acid metabolism. *Neurology*. 1994 Apr;44(4):742-4.
145. Turnbull DM, Bone AJ, Bartlett K, Koundakjian PP, Sherratt HS. The effects of valproate on intermediary metabolism in isolated rat hepatocytes and intact rats. *Biochem Pharmacol*. 1983 Jun 15;32(12):1887-92.
146. Ohtani Y, Endo F, Matsuda I. Carnitine deficiency and hyperammonemia associated with valproic acid therapy. *J Pediatr*. 1982 Nov;101(5):782-5.
147. Thurston JH, Carroll JE, Dodson WE, Hauhart RE, Tasch V. Chronic valproate administration reduces fasting ketonemia in children. *Neurology*. 1983 Oct;33(10):1348-50.
148. Rettie AE, Rettenmeier AW, Howald WN, Baillie TA. Cytochrome P-450--catalyzed formation of delta 4-VPA, a toxic metabolite of valproic acid. *Science*. 1987 Feb 20;235(4791):890-3.
149. Granneman GR, Wang SI, Kesterson JW, Machinist JM. The hepatotoxicity of valproic acid and its metabolites in rats. II. Intermediary and valproic acid metabolism. *Hepatology*. 1984 Nov-Dec;4(6):1153-8.
150. Dreifuss FE, Santilli N, Langer DH, Sweeney KP, Moline KA, Menander KB. Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review. *Neurology*. 1987 Mar;37(3):379-85.
151. Rettenmeier AW, Howald WN, Levy RH, Witek DJ, Gordon WP, Porubek DJ, Baillie TA. Quantitative metabolic profiling of valproic acid in humans using automated gas chromatographic/mass spectrometric techniques. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1989 Mar;18(3):192-9.
152. Bartlett K. Sodium valproate and hyperglycinaemia. *Lancet*. 1977 Oct 1;2(8040):716.
153. Cherruau B, Mangeot M, Demelier JF, Charpentier C, Pelletier C, Lemonnier A. Metabolic abnormalities observed in the rat after administration of sodium dipropylacetate. *Toxicol Lett*. 1981 Apr;8(1-2):39-42.
154. Schmidt-Sommerfeld E, Penn D, Rinaldo P, Kossak D, Li BU, Huang ZH, Gage DA. 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. *Pediatr Res*. 1992 Jun;31(6):545-51.
- 155.Kossak BD, Schmidt-Sommerfeld E, Schoeller DA, Rinaldo P, Penn D, Tonsgard JH. Impaired fatty acid oxidation in children on valproic acid and the effect of L-carnitine. *Neurology*. 1993 Nov;43(11):2362-8.
 - 156.Coulter DL, Allen RJ. Hyperammonemia with valproic acid therapy. *J Pediatr*. 1981 Aug;99(2):317-9.
 - 157.Coudé FX, Rabier D, Cathelineau L, Grimber G, Parvy P, Kamoun P. A mechanism for valproate-induced hyperammonemia. *Adv Exp Med Biol*. 1982;153:153-61.
 - 158.Meleggh B, Kerner J, Bieber LL. Pivampicillin-promoted excretion of pivaloylcarnitine in humans. *Biochem Pharmacol*. 1987 Oct 15;36(20):3405-9.
 - 159.Holme E, Greter J, Jacobson CE, Lindstedt S, Nordin I, Kristiansson B, Jodal U. Carnitine deficiency induced by pivampicillin and pivmecillinam therapy. *Lancet*. 1989 Aug 26;2(8661):469-73.
 - 160.Selby PL, Sherratt HS. Substituted 2-oxiranecarboxylic acids: a new group of candidate hypoglycaemic drugs. *Trends Pharmacol Sci*. 1989 Dec;10(12):495-500.
 - 161.Kler RS, Sherratt HS, Turnbull DM, Melde K. Organic aciduria in fasted rats caused by 2-[6-(4-chlorophenoxy)hexyl]oxirane-2-carboxylate (etomoxir). *Biochem Pharmacol*. 1991 Sep 27;42(8):1637-9.
 - 162.Melde K, Jackson S, Bartlett K, Sherratt HS, Ghisla S. Metabolic consequences of methylenecyclopropylglycine poisoning in rats. *Biochem J*. 1991 Mar 1;274 (Pt 2):395-400.
 - 163.Veitch RK, Sherratt HS, Bartlett K. Organic aciduria in rats made resistant to hypoglycin toxicity by pretreatment with clofibrate. *Biochem J*. 1987 Sep 15;246(3):775-8.
 - 164.Tanaka K, Miller EM, Isselbacher KJ. Hypoglycin A: a specific inhibitor of isovaleryl CoA dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Jan;68(1):20-4.
 - 165.Rhead WJ, Tanaka K. Demonstration of a specific mitochondrial isovaleryl-CoA dehydrogenase deficiency in fibroblasts from patients with isovaleric acidemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Jan;77(1):580-3.
 - 166.Hine DG, Tanaka K. Capillary gas chromatographic/mass spectrometric analysis of abnormal metabolites in hypoglycin-treated rat urine. *Biomed Mass Spectrom*. 1984 Jul;11(7):332-9.
 - 167.Giordano G, McMurray WJ, Previs SF, Welch RD, Rinaldo P. Identification of 2-(2'-octenyl) succinic acid in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 1990 May;4(5):170-2.
 - 168.Kelley RI. Octenylsuccinic aciduria in children fed protein-hydrolysate formulas containing modified cornstarch. *Pediatr Res*. 1991 Dec;30(6):564-9.
 - 169.McGarry JD, Foster DW. Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu Rev Biochem*. 1980;49:395-420.
 - 170.Mortensen PB, Gregersen N. Medium-chain triglyceride medication as a pitfall in the diagnosis of non-ketotic C6-C10-dicarboxylic acidurias. *Clin Chim Acta*. 1980 Apr 11;103(1):33-7.
 - 171.Shigematsu Y, Momoi T, Sudo M, Suzuki Y. (omega-1)-Hydroxymonocarboxylic acids in urine of infants fed medium-chain triglycerides. *Clin Chem*. 1981 Oct;27(10):1661-4.
 - 172.Brass EP, Tserng KY, Eckel RH. Urinary organic acid excretion during feeding of medium-chain or long-chain triglyceride diets in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 1990 Nov;52(5):923-6.

173. Rubaltelli FF, Orzali A, Rinaldo P, Donzelli F, Carnielli V. Carnitine and the premature. *Biol Neonate*. 1987;52 Suppl 1:65-77.
174. Kuhara T, Matsumoto I, Ohno M, Ohura T. Identification and quantification of octanoyl glucuronide in the urine of children who ingested medium-chain triglycerides. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1986 Nov;13(11):595-8.
175. Ledley FD, Levy HL, Shih VE, Benjamin R, Mahoney MJ. Benign methylmalonic aciduria. *N Engl J Med*. 1984 Oct 18;311(16):1015-8.
176. Higginbottom MC, Sweetman L, Nyhan WL. A syndrome of methylmalonic aciduria, homocystinuria, megaloblastic anemia and neurologic abnormalities in a vitamin B12-deficient breast-fed infant of a strict vegetarian. *N Engl J Med*. 1978 Aug 17;299(7):317-23.
177. Specker BL, Miller D, Norman EJ, Greene H, Hayes KC. Increased urinary methylmalonic acid excretion in breast-fed infants of vegetarian mothers and identification of an acceptable dietary source of vitamin B-12. *Am J Clin Nutr*. 1988 Jan;47(1):89-92.
178. Close GC. Rastafarianism and the vegans syndrome. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983 Feb 5;286(6363):473.
179. Goodman SI. Organic aciduria in the riboflavin-deficient rat. *Am J Clin Nutr*. 1981 Nov;34(11):2434-7.
180. Gromisch DS, Lopez R, Cole HS, Cooperman JM. Light (phototherapy)--induced riboflavin deficiency in the neonate. *J Pediatr*. 1977 Jan;90(1):118-22.
181. Tan KL, Chow MT, Karim SM. Effect of phototherapy on neonatal riboflavin status. *J Pediatr*. 1978 Sep;93(3):494-7.
182. Amin HJ, Shukla AK, Snyder F, Fung E, Anderson NM, Parsons HG. Significance of phototherapy-induced riboflavin deficiency in the full-term neonate. *Biol Neonate*. 1992;61(2):76-81.
183. Oriot D, Wood C, Gottesman R, Huault G. Severe lactic acidosis related to acute thiamine deficiency. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1991 Jan-Feb;15(1):105-9.
184. Penn D, Ludwigs B, Schmidt-Sommerfeld E, Pascu F. Effect of nutrition on tissue carnitine concentrations in infants of different gestational ages. *Biol Neonate*. 1985;47(3):130-5.
185. Penn D, Schmidt-Sommerfeld E, Wolf H. Carnitine deficiency in premature infants receiving total parenteral nutrition. *Early Hum Dev*. 1980 Mar;4(1):23-34.
186. Schmidt-Sommerfeld E, Penn D, Bieber LL, Kerner J, Rossi TM, Lebenthal E. Carnitine ester excretion in pediatric patients receiving parenteral nutrition. *Pediatr Res*. 1990 Aug;28(2):158-65.
187. Worthley LI, Fishlock RC, Snoswell AM. Carnitine balance and effects of intravenous L-carnitine in two patients receiving long-term total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1984 Nov-Dec;8(6):717-9.
188. Pichard C, Roulet M, Schutz Y, Rössle C, Chiolerio R, Temler E, Schindler C, Zurlo F, Fürst P, Jéquier E. Clinical relevance of L-carnitine-supplemented total parenteral nutrition in postoperative trauma. Metabolic effects of continuous or acute carnitine administration with special reference to fat oxidation and nitrogen utilization. *Am J Clin Nutr*. 1989 Feb;49(2):283-9.
189. Iapichino G, Radrizzani D, Colombo A, Ronzoni G. Carnitine excretion: a catabolic index of injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1988 Jan-Feb;12(1):35-6.
190. Nanni G, Pittiruti M, Giovannini I, Boldrini G, Ronconi P, Castagneto M. Plasma carnitine levels and urinary carnitine excretion during sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1985 Jul-Aug;9(4):483-90.

191. Mortensen PB, Holtug K, Bonnén H, Clausen MR. The degradation of amino acids, proteins, and blood to short-chain fatty acids in colon is prevented by lactulose. *Gastroenterology*. 1990 Feb;98(2):353-60.
192. McNeil NI, Cummings JH, James WP. Short chain fatty acid absorption by the human large intestine. *Gut*. 1978 Sep;19(9):819-22.
193. Zieve L, Nicoloff DM. Pathogenesis of hepatic coma. *Annu Rev Med*. 1975;26:143-57.
194. Zieve L. The mechanism of hepatic coma. *Hepatology*. 1981 Jul-Aug;1(4):360-5.
195. Pollitt RJ, Fowler B, Sardharwalla IB, Edwards MA, Gray RG. Increased excretion of propan-1,3-diol and 3-hydroxypropionic acid apparently caused by abnormal bacterial metabolism in the gut. *Clin Chim Acta*. 1987 Nov 16;169(2-3):151-7.
196. Bain MD, Jones M, Borriello SP, Reed PJ, Tracey BM, Chalmers RA, Stacey TE. Contribution of gut bacterial metabolism to human metabolic disease. *Lancet*. 1988 May 14;1(8594):1078-9.
197. Rinaldo P, O'Shea JJ, Welch RD, Tanaka K. The enzymatic basis for the dehydrogenation of 3-phenylpropionic acid: in vitro reaction of 3-phenylpropionyl-CoA with various acyl-CoA dehydrogenases. *Pediatr Res*. 1990 May;27(5):501-7.
198. Perlmutter DH, Boyle JT, Campos JM, Egler JM, Watkins JB. D-Lactic acidosis in children: an unusual metabolic complication of small bowel resection. *J Pediatr*. 1983 Feb;102(2):234-8.
199. Schoorel EP, Giesberts MA, Blom W, van Gelderen HH. D-Lactic acidosis in a boy with short bowel syndrome. *Arch Dis Child*. 1980 Oct;55(10):810-2.
200. Haan E, Brown G, Bankier A, Mitchell D, Hunt S, Blakey J, Barnes G. Severe illness caused by the products of bacterial metabolism in a child with a short gut. *Eur J Pediatr*. 1985 May;144(1):63-5.
201. Walker V, Mills GA. Urinary organic acid excretion by babies born before 33 weeks of gestation. *Clin Chem*. 1989 Jul;35(7):1460-6.
202. Walker V, Mills GA. Effects of birth asphyxia on urinary organic acid excretion. *Biol Neonate*. 1992;61(3):162-72.
203. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966 Jul;56(1):236-42.
204. Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem*. 1971 Aug;17(8):802-9.
205. Duez P, Kumps A, Mardens Y. GC-MS profiling of urinary organic acids evaluated as a quantitative method. *Clin Chem*. 1996 Oct;42(10):1609-15.
206. Bishop MJ, Crow BS, Kovalcik KD, George J, Bralley JA. Quantification of urinary zwitterionic organic acids using weak-anion exchange chromatography with tandem MS detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Apr 1;848(2):303-10. Epub 2006 Nov 21.
207. Wang SP, Liao CS. Comparison of ion-pair chromatography and capillary zone electrophoresis for the assay of organic acids as markers of abnormal metabolism. *J Chromatogr A*. 2004 Oct 8;1051(1-2):213-9.
208. Hasegawa Y, Iga M, Kimura M, Shigematsu Y, Yamaguchi S. Prenatal diagnosis for organic acid disorders using two mass spectrometric methods, gas chromatography mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005 Aug 25;823(1):13-7.
209. Liu A, Kushnir MM, Roberts WL, Pasquali M. Solid phase extraction procedure for urinary organic acid analysis by gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004 Jul 5;806(2):283-7.

210. Kawana S, Nakagawa K, Hasegawa Y, Kobayashi H, Yamaguchi S. Improvement of sample throughput using fast gas chromatography mass-spectrometry for biochemical diagnosis of organic acid disorders. *Clin Chim Acta*. 2008 Jun;392(1-2):34-40. Epub 2008 Mar 18.
211. Suh JW, Lee SH, Chung BC. GC-MS determination of organic acids with solvent extraction after cation-exchange chromatography. *Clin Chem*. 1997 Dec;43(12):2256-61.
212. Goodman SI. An introduction to gas chromatography-mass spectrometry and the inherited organic acidemias. *Am J Hum Genet*. 1980 Nov;32(6):781-92.
213. Hoffmann G, Aramaki S, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L. Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Clin Chem*. 1989 Apr;35(4):587-95.
214. Tanaka K, Hine DG, West-Dull A, Lynn TB. Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. I. Retention indices of 155 metabolically important compounds. *Clin Chem*. 1980 Dec;26(13):1839-46.
215. Tanaka K, West-Dull A, Hine DG, Lynn TB, Lowe T. Gas-chromatographic method of analysis for urinary organic acids. II. Description of the procedure, and its application to diagnosis of patients with organic acidurias. *Clin Chem*. 1980 Dec;26(13):1847-53.
216. Nutrition in the 1980s. Constraints on our knowledge. Proceedings of the Western Hemisphere Nutrition Congress VI. Held in Los Angeles, California, August 10-14, 1980. *Prog Clin Biol Res*. 1981;67:1-602.
217. Hosokawa Y, Shimomura Y, Harris RA, Ozawa T. Determination of short-chain acyl-coenzyme A esters by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1986 Feb 15;153(1):45-9.
218. Hoppel CL, Brass EP, Gibbons AP, Turkaly JS. Separation of acylcarnitines from biological samples using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*. 1986 Jul;156(1):111-7.
219. Millington DS, Norwood DL, Kodo N, Roe CR, Inoue F. Application of fast atom bombardment with tandem mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry to the analysis of acylcarnitines in human urine, blood, and tissue. *Anal Biochem*. 1989 Aug 1;180(2):331-9.
220. Millington DS, Terada N, Chace DH, Chen YT, Ding JH, Kodo N, Roe CR. The role of tandem mass spectrometry in the diagnosis of fatty acid oxidation disorders. *Prog Clin Biol Res*. 1992;375:339-54.
221. Mueller P, Schulze A, Schindler I, Ethofer T, Buehrdel P, Ceglarek U. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clin Chim Acta*. 2003 Jan;327(1-2):47-57.
222. Yergey AL, Liberato DJ, Millington DS. Thermospray liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of L-carnitine and its short-chain acyl derivatives. *Anal Biochem*. 1984 Jun;139(2):278-83.
223. Vernez L, Hopfgartner G, Wenk M, Krähenbühl S. Determination of carnitine and acylcarnitines in urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003 Jan 17;984(2):203-13.
224. Lowes S, Rose ME. Simple and unambiguous method for identifying urinary acylcarnitines using gas chromatography--mass spectrometry. *Analyst*. 1990 May;115(5):511-6.
225. Lowes S, Rose ME, Mills GA, Pollitt RJ. Identification of urinary acylcarnitines using gas chromatography-mass spectrometry: preliminary clinical applications. *J Chromatogr*. 1992 Jun 10;577(2):205-14.

226. Huang ZH, Gage DA, Bieber LL, Sweeley CC. Analysis of acylcarnitines as their N-demethylated ester derivatives by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1991 Nov 15;199(1):98-105.
227. Bonafé L, Troxler H, Kuster T, Heizmann CW, Chamoles NA, Burlina AB, Blau N. Evaluation of urinary acylglycines by electrospray tandem mass spectrometry in mitochondrial energy metabolism defects and organic acidurias. *Mol Genet Metab.* 2000 Apr;69(4):302-11.
228. Bennett MJ, Bhala A, Poirier SF, Ragni MC, Willi SM, Hale DE. When do gut flora in the newborn produce 3-phenylpropionic acid? Implications for early diagnosis of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin Chem.* 1992 Feb;38(2):278-81.
229. Bhala A, Bennett MJ, McGowan KL, Hale DE. Limitations of 3-phenylpropionylglycine in early screening for medium-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *J Pediatr.* 1993 Jan;122(1):100-3.
230. Hommes FA, Brewster MA, Burton BK, Buist NR, Elsas LJ, Goldsmith BM, Hammond J, Kruckeberg WC, Leichtman LG, Lin KT, et al. Proficiency testing for biochemical genetics laboratories: the first 10 rounds of testing. *Am J Hum Genet.* 1990 May;46(5):1001-4.
231. Bonham JR, Downing M, Pollitt RJ, Manning NJ, Carpenter KH, Olpin SE, Allen JC, Worthy E. Quality assessment of urinary organic acid analysis. *Ann Clin Biochem.* 1994 Mar;31 (Pt 2):129-33.
232. Bennett MJ, Ragni MC, Hood I, Hale DE. Azelaic and pimelic acids: metabolic intermediates or artefacts? *J Inherit Metab Dis.* 1992;15(2):220-3.
233. Shoemaker JD, Lynch RE, Hoffmann JW, Sly WS. Misidentification of propionic acid as ethylene glycol in a patient with methylmalonic acidemia. *J Pediatr.* 1992 Mar;120(3):417-21.
234. Woolf AD, Wynshaw-Boris A, Rinaldo P, Levy HL. Intentional infantile ethylene glycol poisoning presenting as an inherited metabolic disorder. *J Pediatr.* 1992 Mar;120(3):421-4.
235. Mills GA, Walker V, Mellor JM. 3-Methylisoxazol-5-one, an artefact from acetoacetic acid formed during urinary organic acid analysis. *Clin Chim Acta.* 1989 Sep 15;184(1):93-7.
236. CDC. Using tandem mass spectrometry for metabolic disease screening among newborns. A report of a work group. *MMWR Recomm Rep.* 2001 Apr 13;50(RR-3):1-34.
237. Sweetman, L. Organic acid analysis. In: Hommes, F.I. (ed) *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*, Wiley-Liss, New York, pp. 143-176 (1991).
238. Greter J, Jacobson CE. Urinary organic acids: isolation and quantification for routine metabolic screening. *Clin Chem.* 1987 Apr;33(4):473-80.
239. Wittmann G, Karg E, Mühl A, Bodamer OA, Túri S. Comparison of tetrahydrofuran and ethyl acetate as extraction solvents for urinary organic acid analysis. *J Inherit Metab Dis.* 2008 Feb;31(1):73-80. Epub 2008 Jan 14.
240. Thompson JA, Miles BS, Fennessey PV. Thompson JA, Miles BS, Fennessey PV. Urinary organic acids quantitated by age groups in a healthy pediatric population. *Clin Chem.* 1977 Sep;23(9):1734-8.
241. Haschke-Becher E, Baumgartner M, Bachmann C. Assay of D-lactate in urine of infants and children with reference values taking into account data below detection limit. *Clin Chim Acta.* 2000 Aug;298(1-2):99-109.
242. Conde C, Mazzá M, Almar J, Seijo G, Ballabriga A. Organic acids in urine from preterm infants. *Biol Neonate.* 1979;36(1-2):40-8.

243. Gregersen N, Ingerslev J, Rasmussen K. Low molecular weight organic acids in the urine of the newborn. *Acta Paediatr Scand*. 1977 Jan;66(1):85-9.
244. Jones MG, Cooper E, Amjad S, Goodwin CS, Barron JL, Chalmers RA. Urinary and plasma organic acids and amino acids in chronic fatigue syndrome. *Clin Chim Acta*. 2005 Nov;361(1-2):150-8.