

**DIE ENSIMATIESE BEPALING VAN DIE TOTALE PURIENE IN URINE
BY PERSONE MET AANGEBORE METABOLIESE DEFEEKTE**

Martha Magdalena van den Berg

B.Sc.

**Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die
graad Magister Scientiae in die Departement Biochemie aan die
Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.**

Leier : Mnr. F. H. van der Westhuizen

Medeleier : Mnr. J. Dry

POTCHEFSTROOM

1996

Ek slaan my oë op na die berge:
 waar sal my hulp vandaan kom?
My hulp is van die Here wat hemel
 en aarde gemaak het.
Hy kan jou voet nie laat wankel nie;
 jou bewaarder kan nie sluimer nie.
Kyk, die bewaarder van Israel
 sluimer of slaap nie.
Die Here is jou bewaarder; die Here
 is jou skaduwee aan jou regterhand.
Die son sal jou bedags nie steek nie,
 nòg die maan by nag.
Die Here sal jou bewaar vir elke onheil;
 jou siel sal Hy bewaar.
Die Here sal jou uitgang en jou ingang
 bewaar, van nou af tot in ewigheid.

- Psalm 121 -

Aan Francois, Christo en my familie.
 Dankie vir julle ondersteuning en bystand.

INHOUDSOPGAWE

	bladsy
ABSTRACT.....	1
OPSOMMING.....	3
HOOFSTUK 1: INLEIDING.....	5
HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG.....	7
2.1. Inleiding.....	7
2.2. Purienmetabolisme.....	7
2.2.1. Inleiding.....	7
2.2.2. <i>De novo</i> biosintese	11
2.2.3. Purienomskakeling.....	13
2.2.4. Purienafbraak.....	13
2.2.5. Purienhergebruik en -herwinning.....	16
2.2.6. Regulering van purienmetabolisme.....	16
2.3. Defekte in die purienmetabolisme.....	23
2.3.1. Adenosiendeaminase-defek (ADA-defek).....	23
2.3.2. Adenilosuksinase-defek.....	25
2.3.3. AMP-deaminasedefek.....	26
2.3.4. Adenienfosforibosieltransferase-defek (APRT-DEFEK)	27
2.3.5. Hiperuriensuururie en jig.....	28

2.3.6. Volledige (Lesch-Nyhansindroom) en gedeeltelike (Kelley-Seegmillersindroom) hipoxantien-guanienfosforibosieltransferase-defek (HGPRT-defek).....	31
2.3.7. Molibdeenkofaktor-tekort.....	33
2.3.8. Puriennukleosiedfosforilase-defek (PNP-defek).....	34
2.3.9. Xantienurie.....	35
2.4. Probleemstelling, doelstelling en benaderingswyse.....	37
HOOFSTUK 3: STANDAARDISERING VAN DIE METODE VIR DIE BEPALING VAN TOTALE PURIENE EN URIENSUUR.....	39
3.1. Inleiding.....	39
3.2. Metodes vir die bepaling van die hoeveelheid puriene in biologiese monsters.....	39
3.2.1. Bepaling van puriene afsonderlik.....	39
3.2.2. Die ensimatiese bepaling van die totale hoeveelheid puriene.....	41
3.3. Standaardisering.....	46
3.3.1. Faktore wat in ag geneem is vir die vestiging van die metode.....	46
3.3.1.1. pH.....	46
3.3.1.2. Die samestelling van standaarde: oplosbaarheid.....	46
3.3.1.3. Invloed van inhibeerders.....	47
3.3.1.4. Ensiemkonsentrasies.....	47

3.3.1.5. Temperatuur.....	48
3.3.2. Die eksperimentele opstelling.....	48
3.3.3. Standaardreekse.....	51
3.3.4. Bepaling van die konsentrasies van die onderskeie puriene in standaardoplossings..	52
3.4. Bespreking.....	63
HOOFSTUK 4: DIE ENSIMATIESE BEPALING VAN TOTALE PURIENE EN URIENSUUR IN DIE URINE VAN KONTROLEPERSONE EN PERSONE MET RELEVANTE METABOLIESE DEFEKTE.....	65
4.1. Inleiding.....	65
4.2. Die standaardisering van die metode vir die bepaling van totale puriene en uriensuur in urine.....	66
4.2.1. Inleiding.....	66
4.2.2. Aanpassing van die metode vir die gebruik van urine as substraatbron.....	67
4.2.3. Die ensimatiese bepaling van die totale puriene in die urine van kontrolepersone en persone met relevante metaboliese defekte.....	70
4.2.4. Die bepaling van die konsentrasie uriensuur in urine van kontrolepersone en persone met metaboliese defekte.....	82
4.3. Die evaluering van die konsentrasie totale puriene en uriensuur in 'n kontrole-urien- monster, deur middel van 'n beladingstoets...	93
4.6. Bespreking.....	102

HOOFSTUK 5: BESPREKING.....	105
5.1. Inleiding.....	105
5.2. Standaardisering van die metode.....	105
5.3. Bepaling van totale puriene en uriensuur in urine.....	108
5.3.1. Bepaling van totale puriene in urine.....	108
5.3.2. Bepaling van uriensuur in urine.....	109
5.3.3. Die verhouding van die hoeveelheid totale puriene tot die hoeveelheid uriensuur.....	112
5.3.4. Purien-beladingstoets.....	124
5.4 Koste-bepaling van die metode in vergelyking met die koste van die HPLC-tegniek.....	125
5.5. Voorstelle vir die verbetering van die metode.	127
5.6. Outomatisering.....	129
5.7 Samevatting.....	130
BYLAE A: DIE BEPALING VAN DIE KONSENTRASIE VAN DIE ONDERSKEIE PURIENE IN STANDAARD- OPLOSSINGS	133
BYLAE B: DIE BEPALING VAN DIE KONSENTRASIES TOTALE PURIENE EN URIENSUUR IN URINE.....	151
AFKORTINGS.....	159
BIBLIOGRAFIE.....	161

ABSTRACT

In this study an attempt was made to establish a screening method for the enzymatic determination of total purines in the urine of control persons and persons with relevant deficiencies in order to determine whether a person has a defect in his or her purine metabolism or not. From the literature a method was obtained where the total amount of purines could be determined in one single analysis. This method was further investigated in the research and standardised for use in urine. Urine samples of control persons and persons with adenosine deaminase deficiency, adenylosuccinase deficiency, Lesch-Nyhan syndrome, molybdenum co-factor deficiency, purine nucleoside phosphorylase deficiency, OCT deficiency and xanthinuria were used. By determining the purine content of this urine, purine nucleoside phosphorylase deficiency and molybdenum co-factor deficiency could be identified as abnormal. On the other hand, by determining the uric acid content of this urine, xanthinuria and molybdenum co-factor deficiency could be identified as abnormal. Alternatively, the relationship between the purine content and the uric acid content of urine samples was determined and compared with the control values. In this way molybdenum co-factor deficiency, purine nucleoside phosphorylase deficiency and xanthinuria, as well as a single urine sample for each of the adenylosuccinase deficiency, Lesch-Nyhan syndrome and OCT deficiency, were identified as abnormal. The difference between the values and control values of these defects was more obvious than when using purine content or uric acid content alone. The method used in the research can therefore be used as a screening method, but only for the first three defects mentioned and individuals of the defects mentioned last. This method is relatively inexpensive, because the combined cost of determining purine content and uric acid content of one urine sample amounts to R170. Except in cases where high concentrations of guanosine occur which is broken down slowly because of the relative high cost of

guanase and the fact that the increase of the enzyme concentration would not be cost-effective, the analyses also take relatively little time. To determine the purine content of an urine sample takes a maximum of forty-five minutes and to determine the uric acid content takes a maximum of twenty minutes. A disadvantage of this method is the long preparation time - approximately seventy-five minutes - before the purine content can be determined. During the study it was further found that the determination of the purine content was sensitive to small variations in the purine concentration, while the determination of the uric acid content was not sensitive to small variations in the uric acid concentration. The possibility to automatise the method was also investigated, but because the time that analyses took varied too much, the method could not be automatised fully. By using the Bechman DU-7500 spectrophotometer, the method was semi-automatised in its current form.

OPSOMMING

Met hierdie studie is gepoog om 'n siftingstegniek vir die ensimatiese bepaling van totale puriene in die urine van kontrolepersone en persone met relevante puriende-fekte te vestig, ten einde te bepaal of 'n persoon 'n defek in sy of haar purienmetabolisme het al dan nie. Uit die literatuur is 'n metode verkry waardeur die totale hoeveelheid puriene in 'n enkele analise bepaal kan word. Hierdie metode is verder in die studie ondersoek en gestandaardiseer vir gebruik in urine. Urienmonsters van kontrolepersone en persone met adenosindeaminase-defek, adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhansindroom, molibdeenkofaktor-tekort, puriennukleosiedfosforilase-defek, OCT-defek en xantienurie, is gebruik. Deur die purieninhoud van hierdie urine te bepaal, kon puriennukleosiedfosforilase-defek en molibdeenkofaktor-tekort as abnormaal geïdentifiseer word. Deur aan die ander kant die uriensuurinhoud van hierdie urine te bepaal, kon xantienurie en molibdeenkofaktor-tekort as abnormaal geïdentifiseer word. Alternatiewelik is die verhouding tussen die purieninhoud en die uriensuurinhoud van urienmonsters bepaal en met kontrolewaardes vergelyk. Op hierdie wyse is molibdeenkofaktor-tekort, puriennukleosiedfosforilase-defek en xantienurie, sowel as 'n enkele urienmonster elk van adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhansindroom en OCT-defek, as abnormaal geïdentifiseer. Die verskil tussen hierdie defekte se waardes en kontrolewaardes was meer waarneembaar as met die gebruik van purieninhoud of uriensuurinhoud alleenlik. Die metode wat in hierdie studie ondersoek is, kan dus as siftingstegniek gebruik word, maar net vir eersgenoemde drie defekte en individue van laasgenoemde drie defekte. Hierdie metode is betreklik goedkoop, aangesien die bepaling van purieninhoud en uriensuurinhoud van een urienmonster gesamentlik R170 kos. Behalwe in gevalle waar hoë konsentrasies guanosien voorkom wat stadig afgebreek word as gevolg van die betreklik hoë koste van guanase en die feit dat verhoging van die ensiemkonsentrasie nie koste-

effektief sou wees nie, neem die analyses ook betreklik min tyd in beslag. Die bepaling van die purieninhoud van 'n urienmonster neem maksimaal vyf-en-veertig minute en die bepaling van die uriensuurinhoud maksimaal twintig minute. 'n Nadeel van die metode is die lang voorbereidingtyd - ongeveer vyf-en-sewentig minute - voordat die purieninhoud bepaal kan word. Tydens die studie is verder bepaal dat die purieninhoudbepaling vir klein veranderinge in purienkonsentrasie sensitief is, terwyl die uriensuurinhoudbepaling nie sensitief vir klein veranderinge in uriensuurkonsentrasie is nie. Die moontlikheid om die metode te outomatiseer, is ook ondersoek, maar die tye wat analyses neem, varieer te veel en kan die metode nie ten volle geoutomatiseer word nie. Deur gebruik te maak van die Beckman DU-7500 spektrofotometer, is die metode wel in sy huidige vorm semi-geoutomatiseer.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

'n Groot fokusarea van die hedendaagse mediese wetenskap, is die identifisering van persone met metaboliese defekte. Aangesien 'n persoon se metabolisme, asook die reaksies betrokke by metabolisme, sy of haar hele lewe fisiologies beheer, kan 'n defek in enige gebied van die metabolisme 'n radikale invloed op 'n persoon se lewe hê. Die invloed van sommige defekte is meer radikaal en duidelik sigbaar as ander, maar die meeste defekte kan op die een of ander wyse behandel of beheer word, solank dit betyds geïdentifiseer kan word. Sommige defekte benodig slegs 'n dieetverandering en minimale medikasie, waarna die pasiënt 'n betreklik normale, aktiewe lewe kan lei sonder 'n hewige ontwrigting van sy of haar lewe.

Vir baie defekte bestaan daar reeds biochemiese toetsmetodes waardeur persone met hierdie defekte geïdentifiseer kan word. Oor die algemeen is sodanige toetse akkuraat maar duur en tydrowend, byvoorbeeld gaschromatografie-massaspektrofotometrie (GC-MS), of goedkoop en onakkuraat in terme van kwantifisering, byvoorbeeld labstix. Baie van hierdie meer akkurate toetse kan ook slegs deur hoogs opgeleide personeel gedoen word by onder meer universiteite of groot mediese laboratoriums, aangesien baie van hierdie metodes duur en gesofistikeerde apparaat vereis.

Die neiging wat tans in die navorsing bestaan, is om tegnieke daar te stel wat vinnig en goedkoop, maar tog akkuraat genoeg is en wat makliker deur persone met laer kwalifikasies uitgevoer kan word, met die minste moeite en voorbereiding. Indien sulke tegnieke en metodes nie gebruik kan word om die spesifieke defek by naam te identifiseer nie, moet dit ten minste as 'n siftingstegniek gebruik kan word. Met 'n siftingstegniek word bedoel dat die metode of tegniek met redelike sekerheid moet kan bepaal of 'n persoon wel 'n defek in 'n bepaalde gedeelte

van sy metabolisme, byvoorbeeld purienmetabolisme, het. Dit is dan ook die doel van hierdie studie, naamlik om 'n moontlike siftingstegniek te ondersoek om persone met defekte in hul purienmetabolisme te identifiseer.

Die nut van 'n siftingstegniek is dat indien 'n persoon nie 'n defek in sy of haar purienmetabolisme het soos wat verwag is as gevolg van simptome wat die persoon vertoon het nie, die persoon die koste gespaar is van die duurder metode. Hierdie geld kan dan eerder gebruik word om te bepaal wat werklik die oorsprong van die simptome is. Indien die siftingstegniek wys dat die persoon wel 'n defek in sy of haar purienmetabolisme het, kan 'n meer omvattende metode gebruik word om te bepaal watter defek die persoon wel het.

Die fokuspunt van hierdie studie is die ensimatiese bepaling van die totale puriene in urine van persone met aangebore metabolismiese defekte en in urine van kontrolepersone. Die benadering van die studie is om 'n ensimatiese metode wat reeds in die literatuur beskryf is as die basis vir die studie te gebruik, dit te evalueer en aan te pas vir toepassing op urine van kontrolepersone asook relevante puriendefekte. Dit sal 'n aanduiding gee van die geskiktheid van sodanige metode.

In Hoofstuk 2 word 'n literatuuroorsig gegee van die relevante biochemiese aspekte vir hierdie studie, waarna die eksperimentele werk uiteengesit word (Hoofstukke 3 en 4) en die resultate geëvalueer word (Hoofstuk 5).

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1. INLEIDING

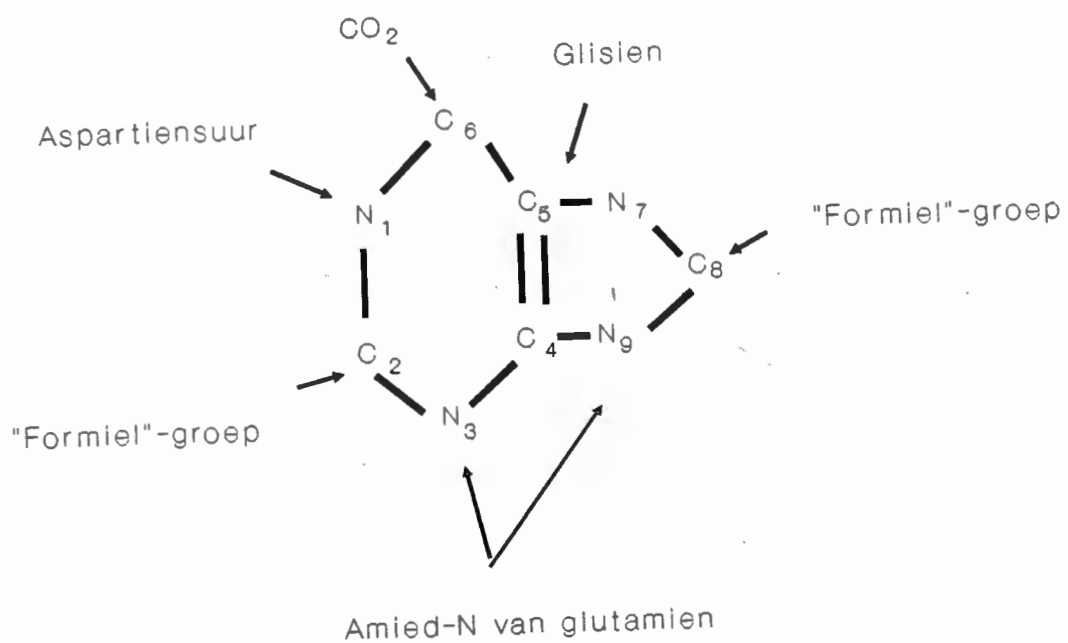
Geen ondersoek kan aangepak word sonder om eers die agtergrond daarvan te bestudeer nie. Uit die doel van die ondersoek, naamlik die ensimatiese bepaling van die totale puriene in die urine van persone met defekte in die purienmetabolisme, is die fokus van die literatuurstudie bepaal. In hierdie hoofstuk is gefokus op die oorsprong van puriene wat in die urine uitgeskei word. Hiervoor is dit nodig om die purienmetabolisme in die mens omvattend te bespreek asook die gevolge van defekte in die purienmetabolisme.

2.2. PURIENMETABOLISME

2.2.1. INLEIDING

Purienmetabolisme in die mens kan in vier fokus-areas beskou word. Eerstens kan op die sintese van purienribonukleotiede gefokus word, en tweedens op die omskakeling daarvan na ander verwante en lewensbelangrike molekules. Derdens, die herwinning daarvan uit ander molekule en laastens die afbraak daarvan na ander molekules wat dan uiteindelik uitgeskei kan word indien dit nie gebruik word nie.

'n Purienverbinding bestaan, soos in Figuur 2.1 aange-
toon, uit 'n nege-ledige puriennukleus, wat weer saamge-
stel is uit pirimidien- en imidasoolringe wat versmelt
is. Die pirimidienring is 'n ses-ledige ringstruktuur wat
stikstofatome bevat by posisies een en drie. Hierdie pir-
imidienring is by posisies vier en vyf verbind aan 'n
imidasoolring, wat ook twee stikstofatome bevat by po-
sisies sewe en nege. Die oorsprong van die verskillende
atome waaruit die purienbase opgebou is, word ook in
Figuur 2.1 aangedui en sal verder in die hoofstuk duide



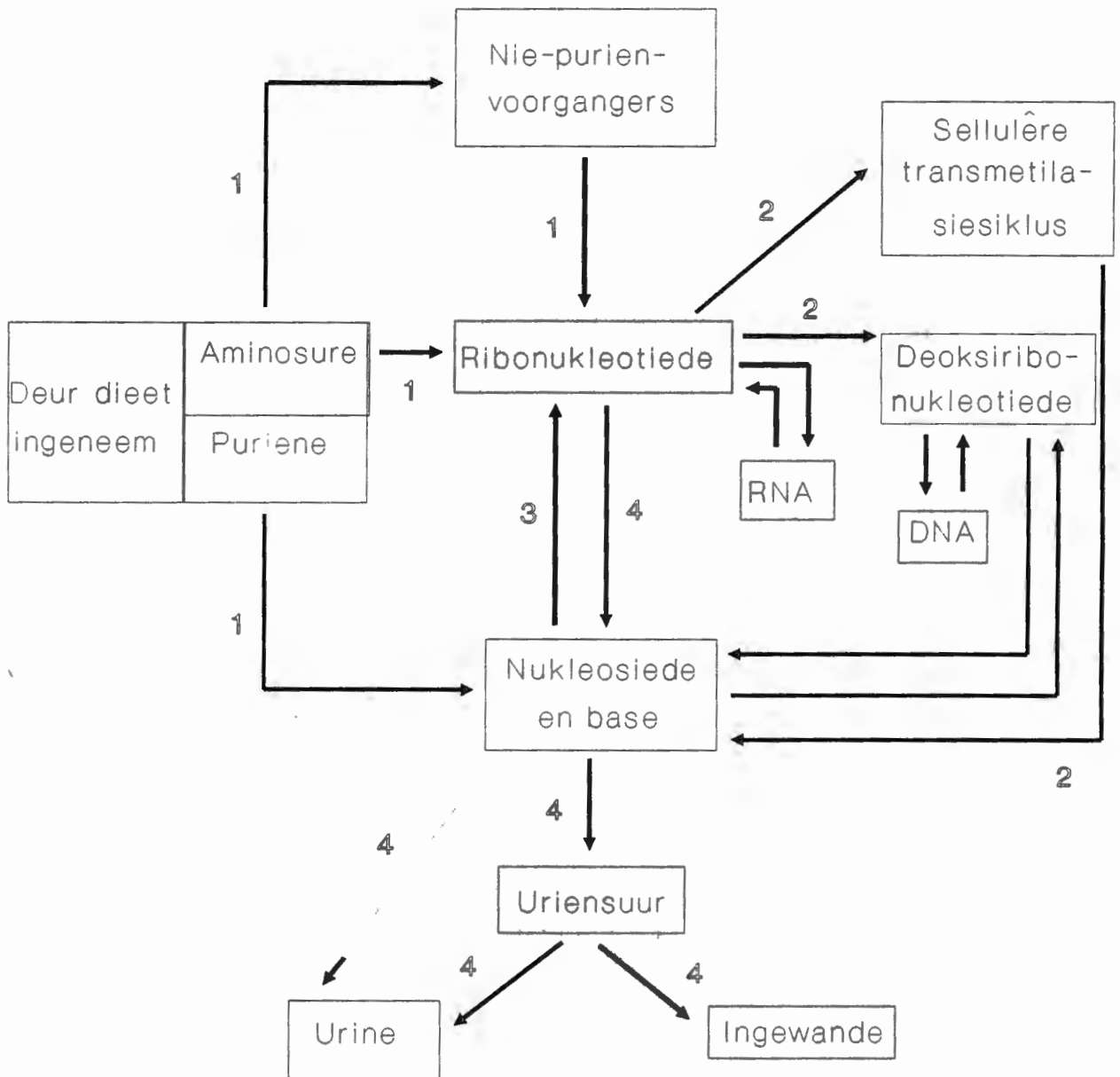
Figuur 2.1: Die oorsprong van die komponente waaruit die purienbase saamgestel is. Dit word ook deur die pyltjies aangedui. (Becker & Roessler, 1995: 1660).

lik word. (Becker & Roessler, 1995: 1660).

Die globale skema vir menslike purienmetabolisme, word in Figuur 2.2 aangedui. Soos skematies aangedui word (Figuur 2.2), kan purienribonukleotiede uit twee hoofbronne gevorm word. Die eerste bron is die nie-purienvoorgangers, wat hoofsaaklik aminosure en suikers is wat deur die dieet ingeneem word. Die tweede bron ontstaan na aanleiding van omskakeling van, en herwinning uit ander bronne, byvoorbeeld nukleosiede en base. Nukleosiede en base kan weer op hulle beurt gevorm word deur die biosintese van puriene wat uit die dieet opgeneem is. Purienbase kan omgeskakel word na die monofosfaattribonukleotiede, wat weer op hul beurt na die di- en trifosfaat en sikliese ribonukleotied-afgeleides omgeskakel kan word. Die trifosfaat-ribonukleotiede vorm substrate vir RNA-sintese. Deoksiribonukleosieddi-fosfate kan ook vanaf difosfaattribonukleotiede, wat substrate is vir DNA-sintese, gevorm word. (Becker & Roessler, 1995: 1660).

Die afbraak van RNA-molekules lei tot die vorming van nukleotiede, terwyl die afbraak van deoksinukleotiede tot die vorming van die nukleosiede, deoksi-adenosien en deoksi-guanosien lei. Al die nukleotiede word in die mens na uriensuur afgebreek. Nukleosiede kan in die mens uitgeskei word, maar in die meeste gevalle verloop die afbraakproses totdat uriensuur gevorm word, wat dan uitgeskei word. (Becker & Roessler, 1995: 1660).

Vier prosesse kan duidelik onderskei word in die purienmetabolisme, naamlik *de novo* biosintese; nukleotiedomskakelings; hergebruik of herwinning en afbraak. Die verhouding tussen hierdie verskillende prosesse word in Figuur 2.2 uiteengesit. In hierdie hoofstuk sal verskillende prosesse verder bespreek word.



Figuur 2.2: Globale skema vir mens purienmetabolisme.

(Becker & Roessler, 1995: 1660).

1: De novo biosintese

2: Omskakeling

3: Herwinning

4: Afbraak

Die purienmetabolisme word in Figuur 2.9 opgesom. Die verskillende onderafdelings van die purienmetabolisme word egter eerstens meer uitgebreid behandel en word skematies voorgestel in Figure 2.3 (*de novo* biosintese), 2.4 en 2.5 (omskakeling), 2.6 (afbraak) en 2.8 (herwinning).

2.2.2. DE NOVO BIOSINTESE

Purienverbindings wat in die liggaam voorkom, word slegs verkry vanuit puriene wat in die dieët opgeneem word asook vanuit inwendige sintese vanuit puriennukleotiede uit nie-purienvoorgangers. Die kern van die purienmolekule bestaan uit 'n pirimidienring wat met 'n imidasoolring versmelt is. Uit hierdie "ouer"-verbinding, wat uit nie-purienvoorgangers gevorm word, word alle purienmolekules gevorm. (Becker & Roessler, 1995: 1660).

Die proses waardeur hierdie "ouer"-verbinding gevorm word, staan bekend as *de novo* biosintese, wat uit elf ensimatiese reaksies of stappe saamgestel is. Die elf ensiemreaksies lei daartoe dat die purienring stapsgewys opgebou word op 'n ribose-5-fosfaatruggraat wat deur 5-fosfo-D-ribosiel- α -1-pirofosfaat (PRPP) voorsien word. (Becker & Roessler, 1995: 1660; Dry, 1994: 7). Die reaksies betrokke by *de novo* biosintese word volledig in Figuur 2.3 uiteengesit.

Tydens die eerste omkeerbare stap word 5-Fosfo-D-ribosiel- α -1-pirofosfaat (PRPP) gevorm, wat 'n belangrike oorgangstof tydens die eerste stap in die *de novo* biosintese is, optree as fosforibosielskenker in die herwinning van purienbases en verder 'n sleutel regulerende substraat in die purienbiosintese is. Aangesien hierdie stap ook by ander reaksies buite die biosintese van purienverbindings betrokke is, word hierdie stap nie beskou as *die eerste stap wat verbind is tot die purienmetabolisme* nie, maar word die stap wat hierop volg, as sulks beskou. Ten spyte hiervan word hierdie stap wel as belangrik beskou. (Becker & Roessler, 1995: 1660; Dry,

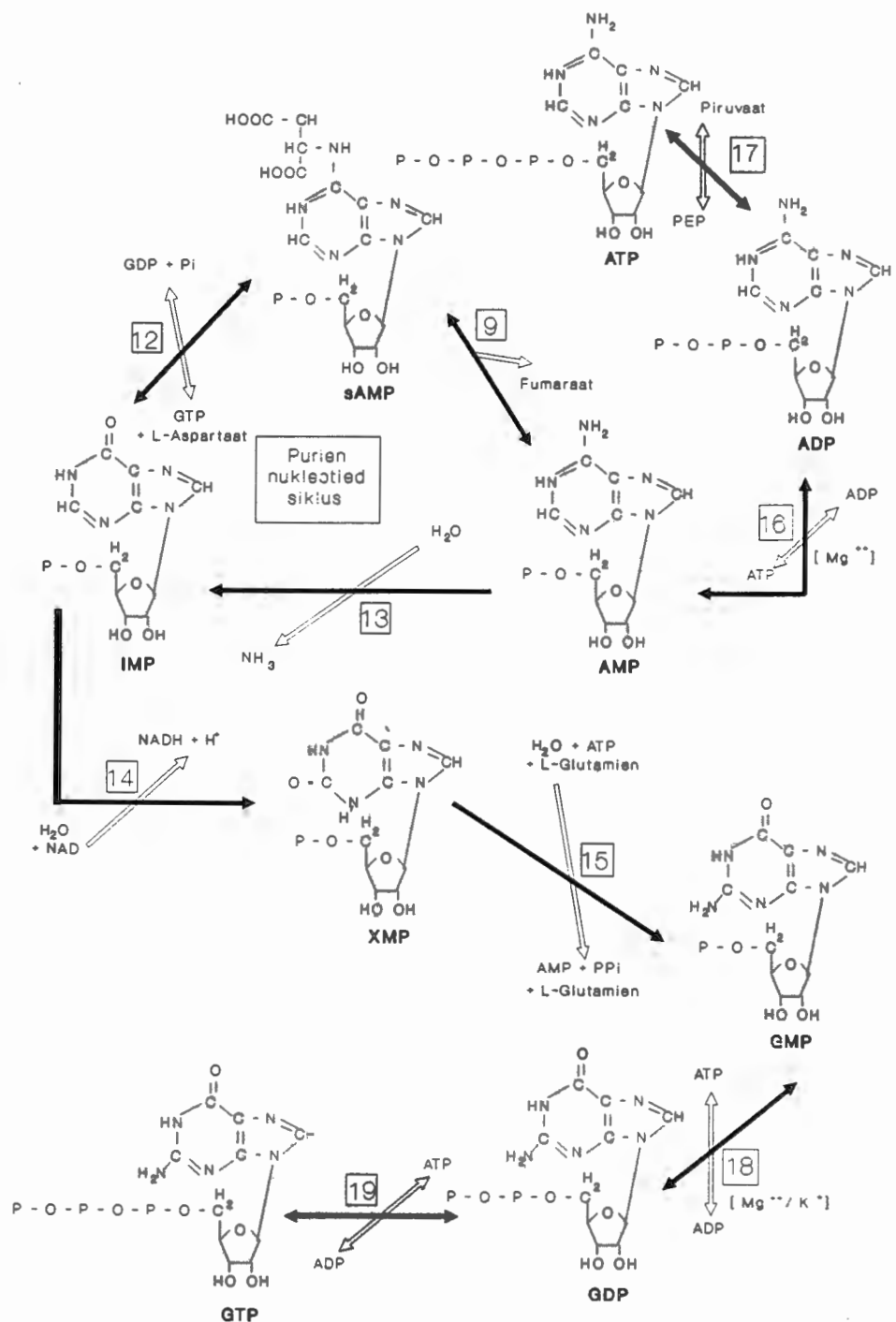
1994: 7-8; Roessler et al., 1993: 26476). Die reaksies wat volg op die reaksie gekataliseer deur amido-fosforibosieltransferase, is gemoeid met die op-bou en sluiting van die purienring. (Becker & Roessler, 1995: 1660).

2.2.3. PURIENOMSKAKELING

'n Kenmerk van purienomskakeling is die sleutelrol van IMP, aangesien dit dien as vertakkingspunt vir alternatiewe biosintese weë wat tot die produksie van adenilate en guanilate, wat die hoofklasse puriennukleotiede is wat betrokke is by die sintese van RNA en DNA, lei. Verder lei dit na die purienafbraak weë wat eindig in die onomkeerbare vorming van uriensuur. Die belangrikste metaboliete wat tydens purienomskakelings gevorm word is GMP, wat via XMP gevorm word, en AMP, wat via sAMP gevorm word. Ander metaboliete wat ook tydens purienomskakeling gevorm word, is adenosien, guanosien, inosien en xantosien. (Becker & Roessler, 1995: 1660; Dry, 1994: 18). Hierdie omskakelingsreaksies word in Figuur 2.4 en Figuur 2.5 voorgestel. Die omskakelings-weë is van mekaar afhanklik, aangesien die produk van die een omskakelingsweg die substraat van die volgende vorm.

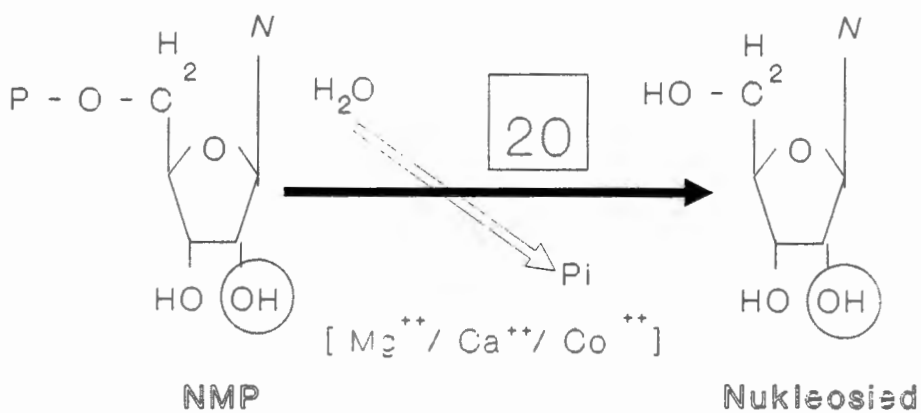
2.2.4. PURIENAFBRAAK

Die katabolisme van puriene bestaan uit 'n reeks reaksies waardeur die puriennukleosied 5'-monofosfate in die mens uiteindelik na uriensuur afgebreek word en in die urine uitgeskei word. (Becker & Roessler, 1995: 1660). Die afbraak van die puriennukleosied 5'-monofosfate na hul ooreenkomstige puriene word in Figuur 2.5 uiteengesit, en die verdere afbraak van die puriene word in Figuur 2.6 uiteengesit. Aangesien uriensuur so 'n belangrike metaboliet is, word die ionisasie van uriensuur in Figuur 2.7 voorgestel.



Figuur 2.4: Purienomskakeling.

(Saamgestel uit Becker & Roessler, 1995: 1662; Palella & Fox, 1989: 976; Van den Berge et al., 1992: 548). 9-19: Ensieme betrokke by die purienomskakeling soos in Figuur 2.9 aangedui word.



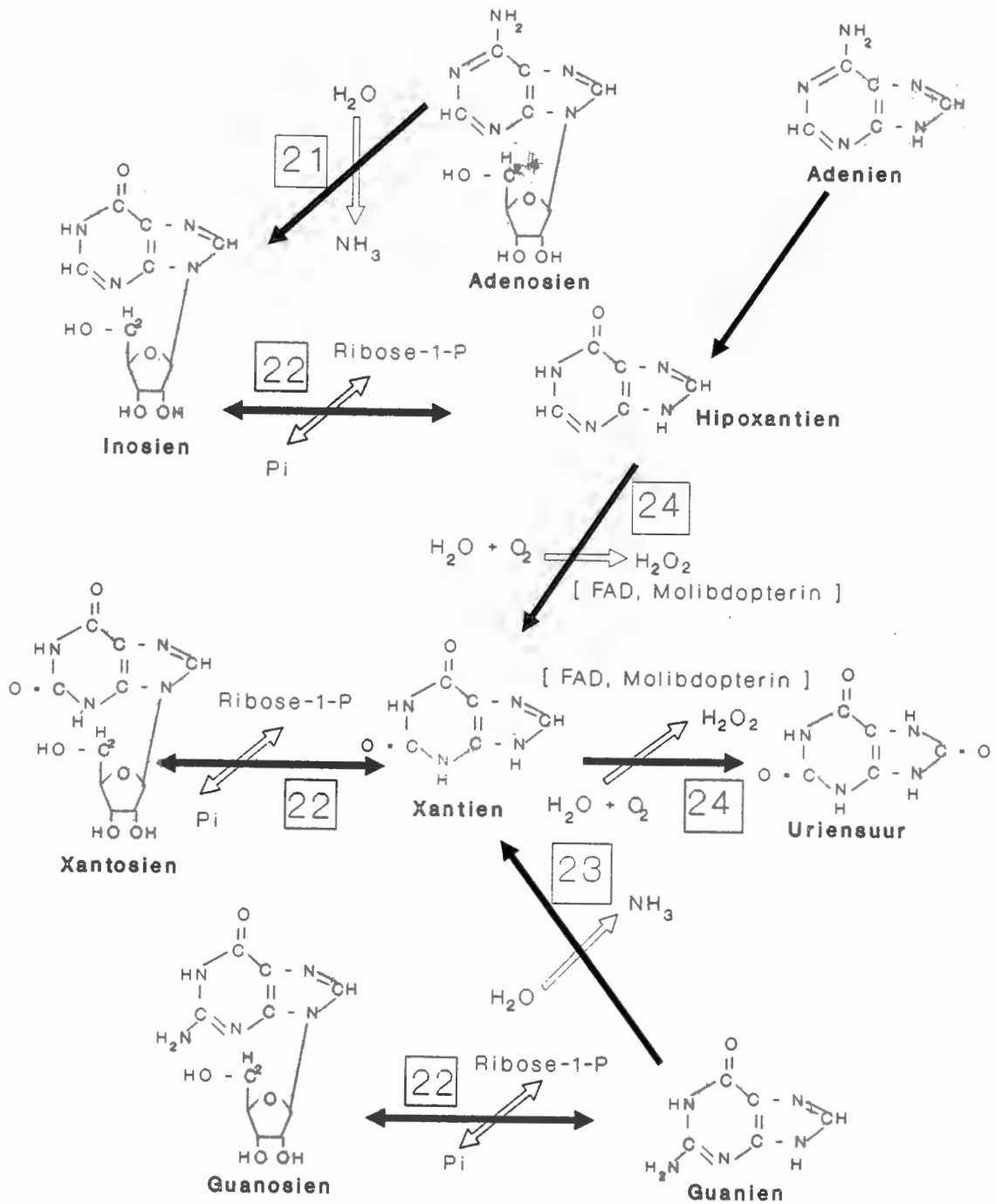
Figuur 2.5: Afbraak van die puriennukleosied 5'-monofosfaat na hul onderskeie puriene (Dry, 1994: 26). 20: 5'-Nukleotidase (sien Figuur 2.9). N: die puriene: adenien, xantien, guanien of hipoxantien. (omsirkelde OH: word vervang met 'n H in die deoksi-analoë).

2.2.5. PURIENHERGEBRUIK EN -HERWINNING

Purienbiosintese *de novo* benodig 6 mol ATP vir die vervaardiging van elke mol puriennukleotiedproduk. Gelukkig bestaan daar 'n komplekse netwerk reaksies, waaronder nukleotiedomskakeling en nukleosied- en baseherwinning, wat verseker dat effektiewe hergebruik van voorafgevormde puriene plaasvind. So bly baie van die sel se energie behoue vir die sintese van nuwe puriene, wat andersins opgebruik sou geword het. (Becker & Roessler, 1995: 1661-1662). Purienherwinning vind plaas tydens drie hoofreaksies wat deur twee ensieme gekataliseer word. Tydens hierdie reaksies word hipoxantien en guanien deur die een ensiem en adenien deur die ander ensiem herwin. (Dry, 1994: 31). Die twee ensieme betrokke, is hipoxantien-guanienfosforibosieltransferase (HGPRT) en adenienfosforibosieltransferase (APRT), wat die fosforibosilasie van die onderskeie purienbases direk na die ooreenstemmende nukleotiede kataliseer deur 'n reaksie met PRPP. (Becker & Roessler, 1995: 1662). Purienherwinning word in Figuur 2.8 uitgebeeld.

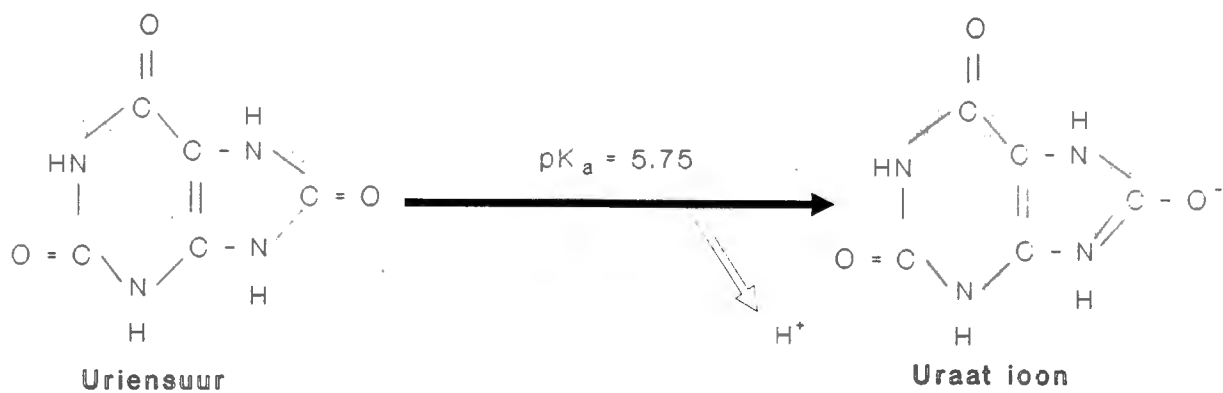
2.2.6. REGULERING VAN PURIENMETABOLISME

Regulering van purienmetabolisme speel 'n baie belangrike rol in die metabolisme en word in Figuur 2.10 skematies voorgestel. Die *de novo* purienbiosintese, die purienomskakeling, die purienafbraak en die purienherwinningsreaksies bied alternatiewe, maar samewerkende wyses vir die regulering van die produksie van puriennukleotiede om aan die behoeftes van die sel te voldoen. In Figuur 2.10 word die belangrikheid van PRPP as regulerende metaboliet duidelik uitgelig, aangesien dit as beginpunt dien vir die eerste reaksie wat tot puriensintese verbind is en dit ook noodsaaklik is vir purienherwinning deur die werking van APRT en HGPRT. (Becker & Roessler, 1995: 1662).

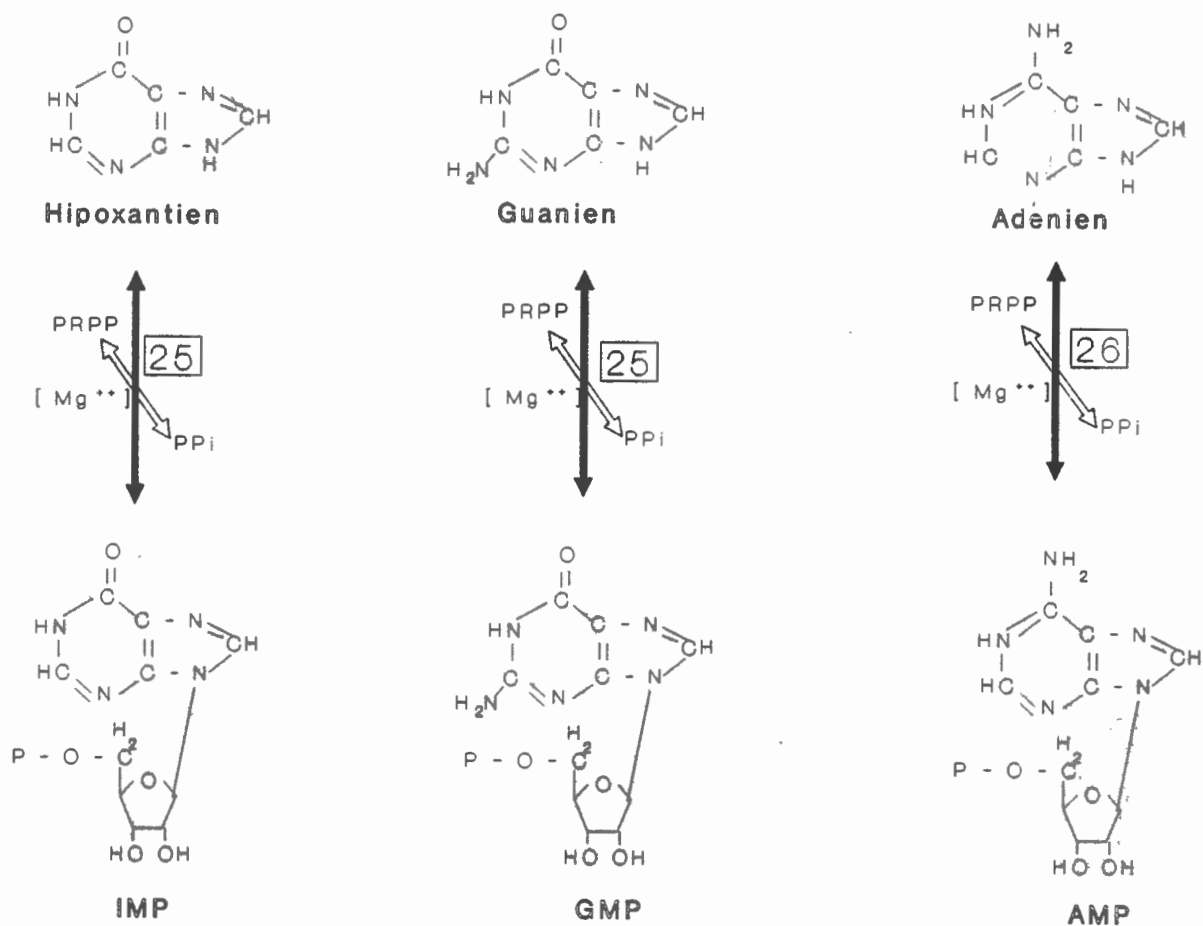


Figuur 2.6: Purienafbraak.

(Saamgestel uit Becker & Roessler, 1995: 1662; Giblett, 1985: 5; Mohamedali et al., 1993: 23729,; Palella & Fox, 1989: 975).
21-24: Ensieme betrokke by purienafbraak soos in Figuur 2.9 aangedui word.



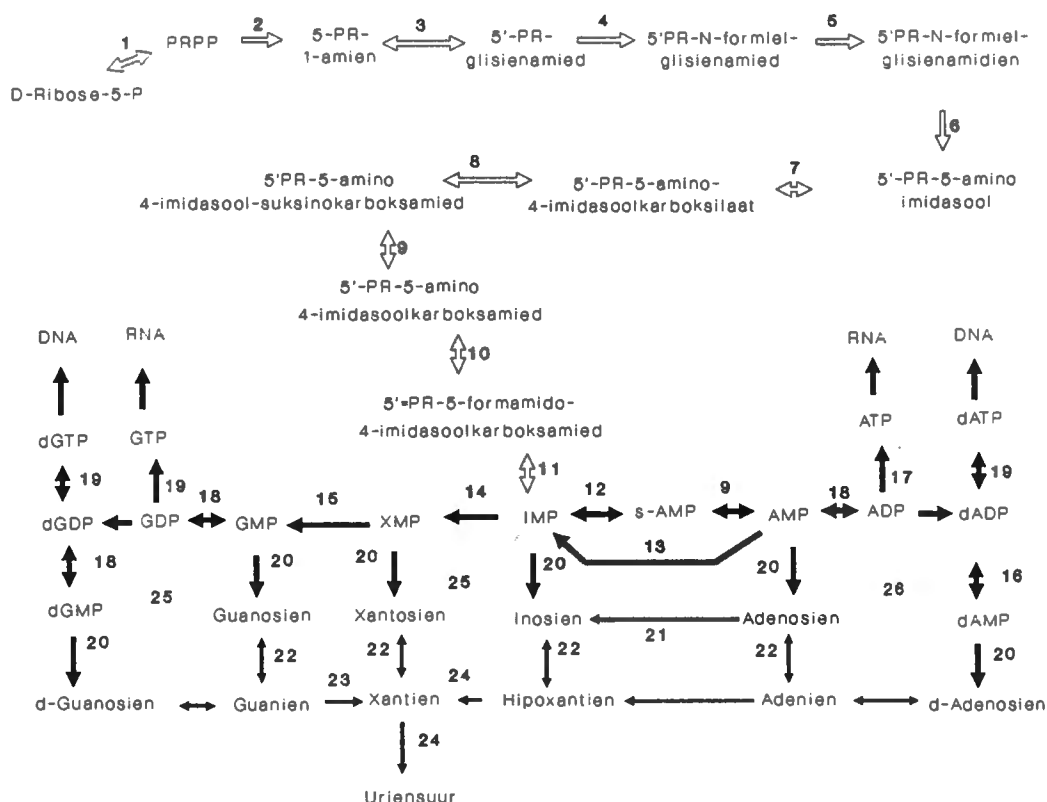
Figuur 2.7: Ionisatie van uriensuur.
(Becker & Roessler, 1995: 1664)



Figuur 2.8: Purienherwinning.

(Saamgestel uit Mateos & Puig, 1994: 138 en Palella & Fox, 1989: 976-977).

25-26: Ensieme betrokke by purienherwinning soos in Figuur 2.9 aangedui word.



Figuur 2.9: Skematiese samevatting van die purienmetabolisme. Saamgestel uit Figure 2.3 tot 2.8. (die afkorting PR word telkens gebruik, wat fosforibosiel is.)
(In hierdie hoofstuk word dieselfde nommers deurgaans vir die ensieme gebruik)

⇒ **De novo biosintese**

1. PRPP sintetase (EC. 2.7.6.1)
2. Amido-PRtransferase (EC. 2.4.2.14)
3. PR-glisienamiedsintetase (EC. 6.3.4.13)
4. PR-glisienamied formieltransferase (EC. 2.1.2.2)
5. PR-formiel-glisienamiedsintetase (EC. 6.3.5.3)
6. PR-aminoimidasoolsintetase (EC. 6.3.3.1)
7. PR-aminoimidasool karboksilase (EC. 4.1.1.21)
8. PR-aminoimidasool-suksinokarboksamied sintetase (EC. 6.3.2.6)
9. Adenilosuksinaatlase (EC. 4.3.2.2)
10. PR-aminoimidasoolkarboksamied formieltransferase (EC. 2.1.2.3)
11. IMP-siklohidrolase

→ **Omskakeling**

12. Adenilosuksinaat sintetase (EC. 6.3.4.4)
13. AMP deaminase (EC. 3.5.4.6)
14. IMP dehidrogenase (EC. 1.1.1.205)
15. GMP sintetase (EC. 6.3.4.1)
16. AMP kinase (EC. 2.7.4.3)
17. Piruvaatkinase (EC. 2.7.1.40)
18. Guanilaatkinase (EC. 2.7.4.8)
19. Nukleosied-difosfaatkinase (EC. 2.7.4.6)
20. 5'-Nukleotidase (EC. 3.1.3.5)

→ **Afbraak**

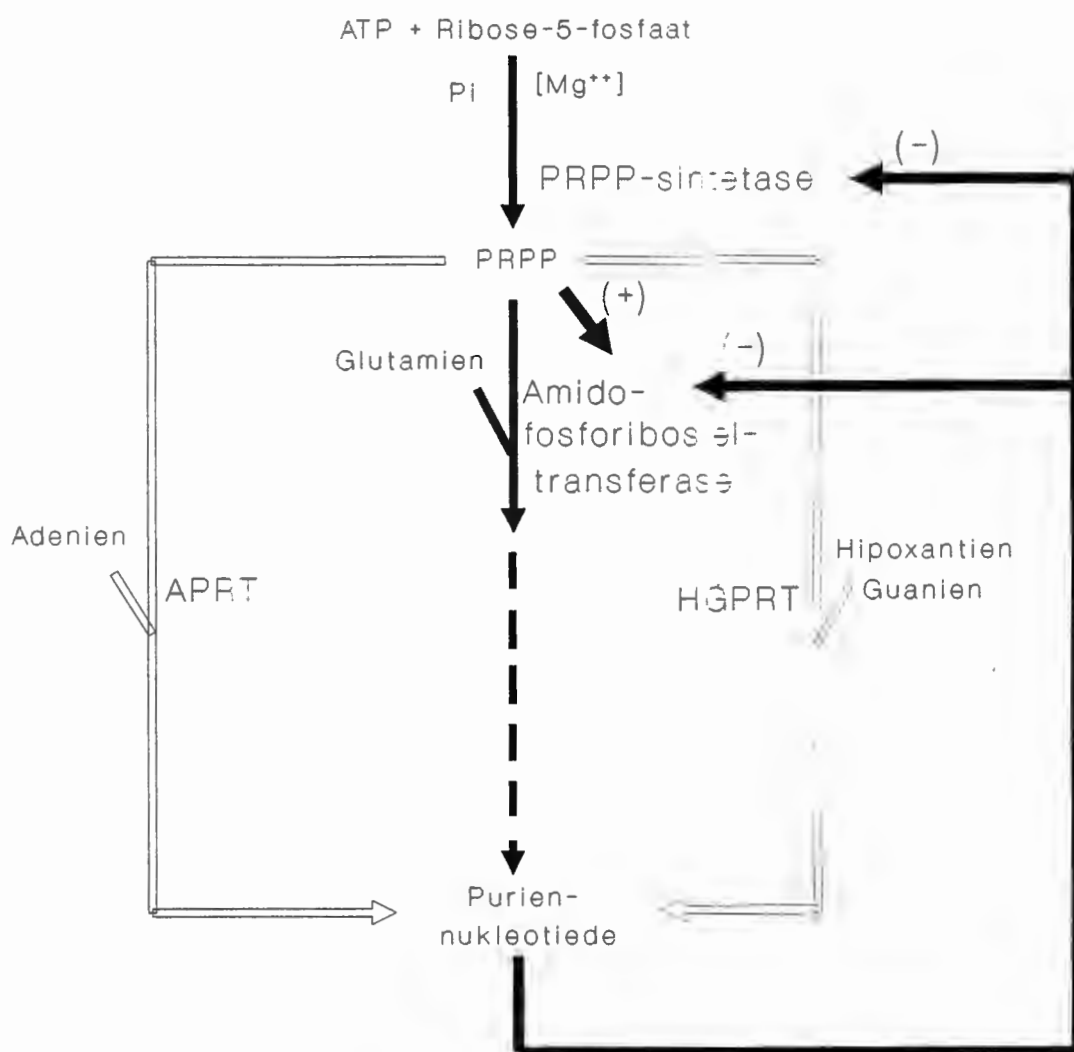
21. Adenosiendeaminase (EC. 3.5.4.4)
22. Puriennukleosiedfosforilase (EC. 2.4.2.1)
23. Guanase (EC. 3.5.4.3)
24. Xantienoksidase (EC. 1.2.3.2)

→ **Herwinning**

25. HGPRT (EC. 2.4.2.8)
26. APRT (EC. 2.4.2.7)

Regulering van die *de novo* puriensintese word beïnvloed deur die eerste stap, gekataliseer deur amidofosforibosieltransferase (sien Figuur 2.9), wat verbind is tot die weg. Dit is ook die belangrikste stap in die regulering van purienmetabolisme. Die reaksie wat dit voorafgaan, naamlik die reaksies gekataliseer deur PRPP-sintetase, (sien Figuur 2.9), is ook 'n belangrike stap tydens regulering. Ander reaksies waartydens regulering plaasvind, is onder meer die reaksies gekataliseer deur fosforibosiel-formiel-glisien-amiedsintetase, adenilosuksinaatliase, fosforibosiel-amino-imidasool-karboksamiedformieltransferase en IMP siklohidrolase (sien Figuur 2.9). (Becker & Roessler, 1995: 1662; Dry, 1994: 33-34). Laasgenoemde reaksies word voorgestel deur stippellyne in Figuur 2.10.

Al die ensieme in die verskillende stappe word deur AMP en GMP geïnhibeer. Dit vind volgens 'n sogenaamde "stadige" meganisme plaas, aangesien dit op die beginsel werk dat ensieme geïnduseer of onderdruk word. 'n "Vinniger" meganisme (alhoewel dit nie fisiologies plaasvind nie), kan by die tweede en vyfde stappe (sien Figuur 2.9) deur inhibisie plaasvind nadat nie-fisiologiese stowwe soos 6-diazo-5-okso-L-norleusien en L-azaserien bygevoeg is. (Dry, 1994: 34). Verdere regulering vind plaas tydens omskakeling, afbraak en herwinning van puriene deurdad die ensieme gewoonlik deur hul produkte geïnhibeer word en in sommige gevalle deur hul substrate geaktiveer word. (Becker & Roessler, 1995: 1663; Dry, 1994: 34).



Figuur 2.10: Regulering van purienmetabolisme.

(Becker & Roessler, 1995: 33-34 en Palella & Fox, 1989: 978-979).



2.3. DEFEKTE IN DIE PURIENMETABOLISME

Verskeie defekte kom in die purienmetabolisme van die mens voor. Dit sluit in adenosindeaminase-defek, adenosuksinase-defek, AMP-deaminasedefek, APRT-defek, hiperuriensuururie en jig, Lesch-Nyhausindroom en gedeeltelike HGPRT-defek, molibdeenkofaktor-tekort, purienukleosiedfosforilase-defek, en xantienurie. Omdat die doelstellings van hierdie studie, wat later uiteengesit word, verband hou met hierdie defekte, word dit vervolgens in meer besonderhede beskryf. By elke defek word die oorsaak, simptome, diagnose en behandeling kortliks uiteengesit.

2.3.1. ADENOSIENDEAMINASE-DEFEK (ADA-DEFEK)

ADA-defek is 'n outosomaal resessiewe eienskap en daar is ook al gevalle van gedeeltelike ADA-defek beskryf. ADA-defek veroorsaak ernstige saamgestelde immunodefek (SCID) en verteenwoordig ongeveer 'n derde van alle gediagnoseerde SCID-gevalle. By persone met 'n gedeeltelike ADA-defek is slegs die ADA in eritrosiete defektief. Die ensiem se aktiwiteit in ander weefsel is laer, maar dit blyk voldoende te wees vir oorlewing. Die meeste van hierdie pasiënte het voldoende immuunfunksie. (Hershfield & Mitchel, 1995: 1725-1748; Kredich & Hershfield, 1989: 1045-1066).

Verskeie **simptome** word waargeneem. By algehele ADA-defek word die vel, longe en maagderm eerste aangetas. 'n ADA-defekpasiënt met SCID wat sy vroeë kinderjare oorleef, is geneig om chroniese longgebreke te ontwikkel as gevolg van chroniese longontsteking. Diarree kom gereeld voor, wat wanvoeding kan veroorsaak. Indien nie vroegtydig opgetree word nie, kan dié kinders baie infeksies en besmettings of sepsis kry, wat veroorsaak dat hulle vroeg sterf (voor hul tweede jaar). Ander kliniese simptome wat waargeneem kan word, is neurologiese abnormaleite soos spierstyfheid, kop wat hang (Engels: *head lag*), bewe-

gingsafwykings en die onvermoë om te fokus. In sommige gevalle is yl hare, anatomiese misvorming van die urienkanale en kortstondige nierbuisasidose ook waargeneem. Dit is nog nie duidelik of hierdie simptome 'n sekondêre gevolg van chroniese infeksie is en of dit bloot toevallig is nie. (Hershfield & Mitchel, 1995: 1725-1748; Kredich & Hershfield, 1989: 1045-1066).

Voorgeboortelike **diagnose** is moontlik deur die aktiwiteit van ADA in die selle van die vrugwater (amnionvloeistof) te bepaal. Die T-limfosiëttelling en ADA-aktiwiteit in die bloed van die fetus kan ook bepaal word, maar dit plaas die pasiënt in onnodige gevaar. Verhoogde vlakke van adenosien, deoksi-adenosien en hul metaboliete kom in beide die urine en serummonsters van ADA-pasiënte voor. Die uriensuurkonsentrasies kan verder ook verhoog wees. In urine is deoksi-adenosien die hoofverbinding wat opgespoor kan word. Dit dui daarop dat adenosien meer effektief in selle hergebruik word as die deoksi-adenosien. Verskeie gemetileerde afgeleides van adenosien kom ook in verhoogde konsentrasies in die urine voor. (Hershfield & Mitchel, 1995: 1725-1748; Kredich & Hershfield, 1989: 1045-1066).

Behandeling bestaan meestal uit ondersteunende sorg van die pasiënt. Dit sluit verskillende grade van isolasie en ontsmetting, gekombineerd met kragtige antibiotikabehandeling in, wat afhang van die tipe infeksie. Inenting teen lewende virusse word ontmoedig en blootstelling aan kindersiektes moet vermy word. Toediening van immunoglobulien word ook as voordelig beskou. (Dry, 1994: 60). Meer spesifieke behandeling sluit onder meer weefseloortplanting, ensiemvervanging, bloedoortapping en metabolietvervanging in. Beenmurg-, lewer- en timusoorplantings het sover nog min sukses gehad en probleme soos 'n tekort aan geskikte skenkers en probleme met die verwerping van oorgeplante weefsel word gereeld ondervind. By ensiemvervanging word probleme weer ondervind met die onstabieliteit van die ensiem en die selmembraandeurlaat-

baarheid vir sommige metaboliëte. Die ensieme kan egter gestabiliseer word deur veranderings aan die ensiem aan te bring, soos die toevoeging van 'n onaktiewe polimeer (byvoorbeeld monometoksipoliëtileen) aan die ensiem. Bloedoortappings was in sommige gevalle ook effektief. Metaboliëtervanging het tot beperkte verbeterings by pasiënte gelei. (Dry, 1994: 60; Giblett, 1985: 5; Herschfield & Mitchell, 1995: 1725-1748; Kredich & Herschfield, 1989: 1045-1066).

2.3.2. ADENILOSUKSINASE-DEFEK

Adenilosuksinase-defek ('n defek van die adenilosuksinaatliase ensiem) is 'n outosomaal resessiewe defek. Dit is 'n baie seldsame defek, wat in die tydperk 1984 (toe die defek die eerste keer ontdek is) tot 1992 in slegs tien pasiënte gediagnoseer is. Twee hooftepes adenilosuksinase-defek kom voor, naamlik tipe I en II. (Van den Berghe et al., 1992: 556).

Verskeie **simptome** word waargeneem. Tipe I adenilosuksinase-defek is 'n ernstiger toestand waarvan die simptome onder meer ernstige psigomotoriese vertraging, onvermoë om oogkontak te maak, en herhalende bewegings en hanteling van voorwerpe, is. By sommige pasiënte kom epilepsie voor, asook gewig- en groeivertraging. Tipe II adenilosuksinase-defek veroorsaak 'n effense tot middelmatige neurologiese vertraging. (Dry, 1994: 61; Van den Berghe et al., 1992: 556).

Diagnose kan gedoen word deur die identifikasie van die suksinielpuriene deur hoëdruk-vloeistofchromatografie (HPLC). Nog 'n diagnostiese toets is die bepaling van lewer adenilosuksinaatliase-aktiwiteit. Adenilosuksinase-defek veroorsaak dat suksino-amino-imidasool-karboksamied-ribosied en suksinieladenosien in verhoogde konsentrasies in die serobrospinale vloeistof, plasma en urine voorkom. In die teenwoordigheid van normale ensiemaktiwiteit is hierdie twee metaboliëte in laasgenoemde lig-

gaamsvloei stowwe onwaarneembaar. (Dry, 1994: 61).

Behandeling van hierdie defek is beperk tot die mondelikse toediening van adenien en allopurinol. Adenien word toegedien omdat die defek moontlik 'n tekort in adenienvlakke by die pasiënt kan veroorsaak, terwyl allopurinol 'n inhibeerder is van die omskakeling van adenien na 2,8-hidroksi-adenien. (Dry, 1994: 61; Van den Berghe et al., 1992: 556).

2.3.3. AMP-DEAMINASEDEFEK

AMP-deaminasedefek is waarskynlik 'n outosomaal resessiewe defek, hoewel dit nog nie bewys is nie. AMP-deaminase (ook bekend as mio- of spieradenilaatdeaminase) is deel van die puriennukleotiedsiklus en speel moontlik 'n belangrike rol in die energieverskaffing van skeletspiere. Tydens oefening verhoog die vorming van IMP en ammoniak ooreenstemmend met die hoeveelheid arbeid wat verrig is, wat daarop dui dat die aktiwiteit van die ensiem verhoog het. Die moontlikheid word uitgespreek dat dit 'n redelike algemene defek kan wees. (Sabina et al., 1989:1077-1082; Sabina & Holmes, 1995: 1769-1777; Van den Berghe et al., 1992: 554-555).

Simptome wat by hierdie defek mag ontstaan na strawwe oefening, is spierswakheid, skielike tamheid en krampe of spierpyn. Ander simptome is onder meer 'n toename in serumkreatinienkinase en geringe elektromiografiese abnormaleite. 'n Afname in spiermassa en histologiese onreëlmatighede kom nie by persone met die defek voor nie. In die meeste gevalle word die defek, met ander woorde die simptome van die defek, eers in 'n laat stadium, tot op 70 jaar, van die pasiënt se lewe waargeneem. Dit kan in sommige gevalle weer reeds so vroeg as 18 maande in die persoon se lewe waargeneem word, hoewel die gemiddelde ouderdom van diagnose 32 jaar is. (Sabina et al., 1989: 1077-1082; Sabina & Holmes, 1995: 1769-1777; Van den Berghe et al., 1992: 554).

Daar is verskeie maniere waarop hierdie defek gediagnoseer kan word, byvoorbeeld die voorarm-oefeningtoets, wat die vorming van laktaat en ammoniak toets. By normale persone vorm beide laktaat en ammoniak, terwyl ammoniak nie by persone met AMP-deaminasedefek gevorm word nie. Finale diagnose word uitgevoer deur histochemiese of biochemiese bepaling van AMP-deaminase in spierbiopsies te doen. (Sabina et al., 1989:1077-1082; Sabina & Holmes, 1995: 1769-1777; Van den Berghe et al., 1992: 554).

Geen spesifieke **behandeling** bestaan vir hierdie defek nie, hoewel ribose gereeld toegedien word omdat dit as 'n glikolitiese substraat en/of as voorganger van PRPP kan dien. Pasiënte word ook aanbeveel om swaar oefening te vermy. (Sabina et al., 1989:1077-1082; Sabina & Holmes, 1995: 1769-1777; Van den Berghe et al., 1992: 555)

2.3.4. **ADENIENFOSFORIBOSIELTRANSFERASE-DEFEK (APRT-DEFEK)**

APRT-defek is 'n outosomaal resessiewe defek. Tot en met 1989 is 32 pasiënte met APRT-defek gediagnoseer, van wie twee derdes mans was. By 'n verdere 31 gevalle is 'n verlaagde APRT-aktiwiteit van 25% van die normale waardes waargeneem. (Dry, 1994: 63). Drie tipes APRT-defekte kom voor. Tipe I word gekenmerk deur die algehele afwesigheid van APRT-aktiwiteit en kom meestal by Kaukasiërs voor. Tipe II word gekenmerk deur gedeeltelike APRT-defek en word met die Japannese bevolking geassosieer. Tipe III word ook gekenmerk deur gedeeltelike APRT-aktiwiteit, maar is asimptomaties en word nie met enige vorm van die defek geassosieer nie. (Simmonds et al., 1989: 1029-1040; Simmonds et al., 1995a: 1707-1719).

Pasiënte met hierdie defek vertoon slegs kliniese **simptome**, wat wissel van gering tot lewensgevaarlik indien 2,8-dihidro-adenien (2,8-DHA) uitgeskei word. 2,8-DHA-kristalurie kan voorkom sonder enige kliniese simptome, maar dit kan nierskade veroorsaak. Ander simptome kan

voorkom, soos koors, as gevolg van urienkanaalinfeksie, makroskopiese bloedurining of hematurie, pynlike urining of disurie, urienretensie en abdominale koliek. Soms kan akute anuriese nierversaking en niersteenvorming (as gevolg van 2,8-DHA-kristalle) voorkom. (Simmonds et al., 1989: 1029-1040; Simmonds et al., 1995a: 1707-1719).

Wat **diagnose** by hierdie metaboliese defek betref kan homosigote met tipe I of II APRT-defek, deur middel van karakteristieke geelbruin ronde 2,8-DHA kristalle wat in die urine uitgeskei word, geïdentifiseer word. Ook asimptomatiese pasiënte kan op dié manier gediagnoseer word. Hierdie kristalle kan egter met uriensuurkristalle verwar word. Finale diagnose kan gemaak word deur middel van onder meer infrarooispektrometrie, massaspektrometrie, X-straalkristallografie en UV-spektrums. (Simmonds et al., 1989: 1029-1040; Simmonds et al., 1995a: 1707-1719).

Behandeling van APRT-defek geskied deur die dieet. Pasiënte moet verkieslik op 'n lae puriendieet gehou word om die inname van adenien te beperk, aangesien dit tot die kliniese beeld bydra. Saam met die dieet kan allo-purinol toegedien word, want dit vertraag die vorming van 2,8-DHA-kristalle. Dit inhibeer nie die uitskeiding van adenienverbindinge nie, maar herrangskik eerder die metabolietverhoudings sodat adenien die hoofproduk is wat in die urine uitgeskei word, eerder as 2,8-DHA. (Simmonds et al., 1989: 1029-1040; Simmonds et al., 1995a: 1707-1719).

2.3.5. HIPERURIENSUURURIE EN JIG

Jig kan as 'n heterogene groep defekte wat eksklusief in die mens gevind word, beskou word. Jig word erken as 'n genetiese defek, maar oorerwing is onreëlmatig, sodat daar nog nie 'n patroon waarvolgens dit oorgeërf word, vasgestel is nie. Aangesien jig geassosieer word met hiperuriensuururie, en hiperuriensuururie klinies waarneembare jig vooruitgaan, is die ondersoek van die

oorerwing van jig geassosieer met die ondersoek na oor-
erflike hiperuriensuururie. (Becker & Roessler, 1995:
1655-1660; Newcombe, 1975: 38-48; Stecher, 1957: 56).
Daar is egter al gevalle gevind waar die uriensuurvlakke
by jiglyers normaal is (McCarty, 1994: 302).

Ten volle ontwikkelde jig kan gekenmerk word deur enige
kombinasie van die volgende verskynsels, naamlik 'n ver-
hoging in die uriensuurkonsentrasie van serum; herhaalde
aanvalle van 'n bepaalde tipe akute gewrigsontsteking of
artritis waar mononatrium-uraat-monohidraat kristalle in
die leukosiete van die gewrigsvloeistof voorkom;
saamgestelde neerslae van mononatrium-uraat-monohidraat
(of jigknobbel) wat meestal in of rondom die gewrigte van
die uiterste ledemate voorkom, wat soms daartoe kan lei
dat 'n persoon ernstig kreupel en misvorm word; nier-
siekte wat die nierliggaam, buisvormige en interstisiële
weefsels en bloedvate betrek; en uriensuursteenvorming.
Daar is al verskeie oorsake van hiperuriensuururie vas-
gestel, wat onder meer verhoogde vlakke van PRPP, ver-
laagde hergebruik van hipoxantien, verhoogde ATP-afbraak,
verlaagde ATP-sintese, verhoogde nukleïensuuromset, ver-
snelde nukleotiedafbraak, oormatige inname van puriene
deur die dieet en verskeie nierafwykings, insluit.
(Becker & Roessler, 1995: 1655-1660).

PRPP-sintetasesuperaktiwiteit, wat ook tot hiperurien-
suururie aanleiding kan gee, word oorgeërf as 'n X-gekop-
pelde verskynsel. PRPP-sintetasesuperaktiwiteit word
gekenmerk deur een van vier defekte wat by die ensiem
PRPP sintetase kan voorkom. By die eerste defek besit die
ensiem 'n onvermoë om deur sy eie produkte geïnhibeer te
word. By die tweede defek werk die ensiem konstant teen
maksimum reaksiesnelheid, hoewel die inhibisie-eienskappe
en affiniteite van die ensiem vir sy substrate normaal
blyk te wees. By die derde defek toon die ensiem 'n ver-
hoogde affiniteit vir ribose-5-fosfaat. Die vierde defek
bestaan uit 'n kombinasie van die eerste en die derde de-
fekte. Uriensuur-oorproduksie in persone met PRPP-sinte-

tase superaktiwiteit is die gevolg van 'n verhoogde produksie van PRPP en die daaropvolgende versnelling van die *de novo* puriensintese. (Becker & Roessler, 1995: 1655-1660; Newcombe, 1975: 34-38; Roessler et al., 1993: 26476).

Simptome van hiperuriensuururie sluit in jigagtige artritis of gewrigsonsteking, chroniese jig en niersiekte wat die gevolg is van die presipitasie of neerslag van uriensuurkristalle in die liggaamsvloeistowwe en weefsel. Kliniese simptome soos aanvalle van baie pynlike artritis tydens akute jig is algemeen. Aan die begin kan die akute jig beperk wees tot een gewrig, maar in latere stadiums kan dit na meer gewrigte versprei en kan koors ook begin voorkom. Doofheid kan ook soms met PRPP-sintetasesuperaktiwiteit geassosieer word. Pasiënte met PRPP-sintetasedefek kan swak neurale ontwikkeling en funksie ontwikkel, wat kan lei tot ernstige verstandelike en selfs motoriese vertraging. (Dry, 1994: 65). Akute jigagtige artritis kan teenwoordig wees sonder dat die uriensuur in die serum tot bo-normale vlakke styg. Soortgelyke gevalle kan dus slegs op grond van die simptome van akute jigagtige artritis gediagnoseer word. (Becker & Roessler, 1995: 1655-1660; McCarty, 1994: 302).

Beide asimptomatiese hiperuriensuururie en jigagtige artritis moet **behandel** word, anders kan nierskade ontstaan. Daar bestaan ook moontlik 'n verband tussen hiperuriensuururie, hoë bloeddruk (hipertensie), hiperlipidemie en vetsug, en dit kan veroorsaak dat hierdie defek 'n kardiovaskulêre risikofaktor kan wees. Die behandeling van hiperuriensuururie met medikasie kan uitgestel word totdat jigagtige artritis ontwikkel waarna behandeling noodsaaklik begin word. Daar moet egter onderskeid getref word tussen geneesmiddels wat gebruik word vir die behandeling van akute jig, en dié wat gebruik word om hiperuriensuururie effektief te beheer. Die een tipe geneesmiddel kan nie vir die behandeling van die ander probleem gebruik word nie. Akute jigagtige artritis kan

effektief behandel word met nie-steroïed, nie-ontstekende geneesmiddels en binne-aarse kortikosteroïde toediening. Hiperuriensuururie word behandel met anti-hiperuriensuururiegeneesmiddels soos *probenecid* en sulfien-pirason, bensbromaroon, bensiodaroon en zoxazolamien, wat opruiming van uriensuur in die niere verhoog. Allopurinol word weer gebruik om uriensuurvorming te verminder, aangesien dit self 'n substraat van XOD is. Allopurinol oksideer in hierdie geval na oksipurinol, wat XOD inhibeer. Die uriokosurien (Engels: *uricosuric*) geneesmiddels is swak organiese sure wat nierreabsorpsie van uriensuur inhibeer om so uriensuuruitskeiding te verhoog. Behandeling gaan gewoonlik verder gepaard met 'n lae puriendieet. (Becker & Roessler, 1995: 1655-1660).

2.3.6. VOLLEDIGE (LESCH-NYHANSINDROOM) EN GEDEELTELIKE (KELLEY-SEEGMILLERSINDROOM) HIPOXANTIEN-GUANIEN-FOSFORIBOSIELTRANSFERASE-DEFEK (HGPRT-DEFEK)

Lesch-Nyhansindroom is 'n X-gekoppelde defek en kom dus meestal by mans voor. Persone met Lesch-Nyhansindroom kan ook nie kinders voortbring nie. Sover bekend, het daar nog net by een vroulike persoon Lesch-Nyhansindroom ontwikkel. (Dry, 1994: 66-67). By Lesch-Nyhansindroom is die HGPRT-aktiwiteit byna heeltemal afwesig, terwyl dit by Kelley-Seegmillersindroom net gedeeltelik afwesig is. (Mateos & Puig, 1994: 138; Newcombe, 1975: 26-33, 53-78; Rossiter & Caskey, 1995: 1679-1696; Stout & Caskey, 1989: 1007).

Kliniese **simptome** wat algemeen by pasiënte met Lesch-Nyhansindroom voorkom, is onder meer hiperuriensuururie, chorea-atetoïedale- (Engels: *Choreoathetoid*) bewegings, spierstyfheid, oormatige refleksbewegings (Engels: *hyper-reflexia*), verstandelike vertraging en selfverminking of selfskending. Kliniese simptome wat met Lesch-Nyhansindroom geassosieer word, is afwesig by geboorte, maar die meeste daarvan ontwikkel gewoonlik binne 'n jaar. By gedeeltelike HGPRT is hiperuriensuururie 'n simptoom wat

tot die vorming van nierstene en jigagtige artritis lei. Ongeveer 20% van die pasiënte wat aan gedeeltelike HGPRT ly het ook simptome soos spierstyfheid, serebrale koördinasiesteurings of spierstoornis, asook geringe verstandelike vertraging, terwyl selfverminking nie v like vertra (Dry, 1994: 66-67; Newcombe, 1975: 26-33, 53-78). Tekort aan HGPRT lei tot verlaagde hergebruik van purienbase en tot 'n laer verbruik van PRPP. Albei gevolge dra by tot verhoogde *de novo* uriensuursintese. HGPRT-defek kan ook verantwoordelik gehou word vir verhoogde hipoxantien- en xantienkonsentrasies in biologiese vloeistowwe, wat verder ook bydra tot uriensuursintese. Beide soorte HGPRT-defekte vertoon verhoogde purienoorproduksie en adenien nukleotiedafbraak. (Mateos & Puig, 1994: 138; Newcombe, 1975: 26-33, 53-78; Rossiter & Caskey, 1995: 1679-1696; Stout & Caskey, 1989: 1008-1009).

Pasiënte kan **gediagnoseer** word voordat selfverminking begin. Gewoonlik kan neurologiese wanfunksionering voor die ouderdom van een jaar opgemerk word, nadat chorea-ate-toïedale bewegings ontwikkel het. Pasiënte ly gewoonlik aan hipotonia wat kan ontwikkel tot 'n spastiese hiper-toniese distonia. Die eerste teken van hiperuriensuururie kan waargeneem word in die vorm van kristalle in die urine. Voorgeboortelike diagnose is ook moontlik deur prenatale ensiemanalise. Uriensuur hoop op as gevolg van hiperuriensuururie wat 'n simptoom is van beide volledige en gedeeltelike HGPRT-defek. (Newcombe, 1975: 26-33, 53-78; Rossiter & Caskey, 1995: 1679-1696; Stout & Caskey, 1989: 1021-1022).

Die hiperuriensuururie wat vorm, kan vir beide die volledige en gedeeltelike HGPRT-defek **behandel** en beheer word deur die toediening van allopurinol. Aangesien die oorsaak van die neurologiese abnormaleite in Lesch-Ny-hansindroom nie bekend is nie, is verskeie behandelingswyses al gevolg. Die sukses en effektiwiteit van die behandelingswyses wissel tussen die verskillende pasiënte, terwyl sommige behandelingswyses ongewenste

neue-effekte het. Van hierdie behandelings sluit onder meer in die toediening van purienmetaboliete soos PRPP en hipoxantien, asook folaat, glutamien, magnesium, L-5-hidroksitriptofaan, L-triptofaan, karbidopa, metiel-dopa, orotiensuur, tiopropasaat, chlorpromasien, asook bloed-oortappings. (Newcombe, 1975: 26-33, 53-78; Rossiter & Caskey, 1995: 1679-1696; Stout & Caskey, 1989: 1022-1023).

2.3.7. MOLIBDEENKOFAKTOR-TEKORT

Molibdeenkofaktor is 'n komplekse verbinding wat noodsaaklik is vir die funksionering van die ensieme sulfied-oksidasie, XOD en aldehyd-oksidasie. 'n Defek van die kofaktor lei tot 'n gekombineerde defek van dié betrokke ensieme, wat 'n abnormale swael- en xantienmetabolisme, sowel as 'n ernstige kliniese beeld, kort na geboorte, en 'n vroeë dood, veroorsaak. Hierdie is 'n baie seldsame aangebore defek, moontlik omdat die defek gewoonlik fataal is in die pasgebore stadium en omdat dit diagnose in hierdie stadium maklik kan vryspring. Molibdeenkofaktor-tekort word oorgeërf as 'n outosomaal resessiewe defek. Die oorsprong van die werklike defek is nie bekend nie, hoewel die simptome daarvan moontlik die gevolg is van die feit dat sulfied-dehidrogenase onaktief is. Hierdie afleiding word gemaak omdat die kliniese simptome van pasiënte waar sulfied-dehidrogenase defektief is, maar wat normale molibdeen-kofaktor en XOD het, dieselfde is as die simptome van molibdeenkofaktor-tekort. (Bakker et al., 1993: 900; Fujitaka et al., 1991: 843; Johnson & Wadman, 1989: 1463-1473; Johnson & Wadman, 1995: 2271-2281; Van Gennip et al., 1994: 142).

Simptome: Molibdeenkofaktor-tekort is 'n defek wat in die meeste gevalle tot die dood lei, of andersins tas dit die pasiënte so ernstig aan dat hulle gewoonlik in spesiale inrigtings versorg moet word. Kliniese simptome van molibdeenkofaktor-tekort sluit onder meer in: voedingstoornisse binne die eerste dae na geboorte; fisiese

misvormings (gewoonlik van die kop), wat soms reeds by die geboorte waarneembaar is; neurologiese simptome; toniese of kloniese (Engels: *clonic*) stuipe wat weerstand bied teen antistuipekkers of wat moeilik is om te onderdruk; aksiale hipotonia en perifere hiperspierwerking (Engels: *hypertonicity*). Dit wil voorkom asof breinskade reeds voor geboorte plaasvind. Lensontwrigting ontwikkel by pasiënte wat die neonatale periode oorleef. By sekere pasiënte het patologiese toetse aangedui dat ernstige wegkwyning van, en veranderings in die breine van hierdie pasiënte, plaasgevind het. (Bakker et al., 1993: 900; Johnson & Wadman, 1989: 1463-1473; Johnson & Wadman, 1995: 2271-2281).

Die defek word **gediagnoseer** deur die teenwoordigheid van verhoogde vlakke van S-sulfosisteïen en tiosulfaat wat ontstaan as gevolg van die defekte werking van sulfiedoksidase. 'n Verdere rede is verhoogde konsentrasies hipoxantien wat ontstaan as gevolg van die defekte werking van XOD. Uriensuurkonsentrasies is gewoonlik verlaag. Indien vars urine ontleed word, kan die sulfiet in die urine met 'n toetsstrokie bepaal word. Sulfiet, tiosulfaat en sulfaat kan verder kwantitatief bepaal word deur chromatografiese prosedures. Voorgeboortelike diagnose kan gemaak word deur gebruik te maak van selle in die amnionvloeistof vir ensiemanalise. (Johnson & Wadman, 1989: 1463-1473; Johnson & Wadman, 1995: 2271-2281).

Geen effektiewe **behandeling** bestaan vir Molibdeenkofaktor-tekort nie. (Johnson & Wadman, 1989: 1463-1473; Johnson & Wadman, 1995: 2271-2281; Van Gennip et al., 1994: 142).

2.3.8. PURIENNUKLEOSIEDFOSFORILASEDEFEK (PNP-DEFEK)

PNP-defek word oorgedra in 'n outosomaal resessiewe wyse. PNP-defek veroorsaak 'n immuungebrek wat gekenmerk word deur 'n tekort aan T-limfosiëte. (Kline & Schramm, 1992: 5964; Kredich & Herschfield, 1989: 1045-1066; Herschfield &

Mitchel, 1995: 1725-1748).

Simptome ontwikkel reeds tussen die vierde en die negende maand van 'n pasiënt se lewe, en sluit gewoonlik infeksies van die vel, longe, middeloor, agteroorbeen en urienkanale in. Hierdie tipe infeksies word gewoonlik nie deur bakterieë veroorsaak nie. Ongeveer die helfte van al die pasiënte toon neurologiese afwykings, soos spastiese dubbelsydige verlamming, kop wat hang (Engels: *head lag*), hipotonia, vertraging in ontwikkeling en irriteerbaarheid. Sommige pasiënte ontwikkel bloedarmoede. Die meeste pasiënte ly aan hipo-uriensuururie, maar skei uitermatige hoeveelhede inosien, guanosien, 2-deoksi-inosien en 2-deoksi-guanosien in die urine uit, terwyl die vlakke van inosien en guanosien in die serum ook verhoog is. (Kline & Schramm, 1992: 5964; Kredich & Hershfield, 1989: 1045-1066; Hershfield & Mitchel, 1995: 1725-1748).

PNP-defek kan by 'n persoon gediagnoseer word op grond van immuungebrek en die verhoogde of verlaagde vlakke van die reedsgenoemde metaboliëte. Voorgeboortelike diagnose is ook reeds beskryf. (Kredich & Hershfield, 1989: 1045-1066; Hershfield & Mitchel, 1995: 1725-1748).

Behandeling van pasiënte met PNP-defek is dieselfde as vir persone met 'n ADA-defek (Afdeling 2.3.1.). (Giblett, 1985: 5; Kredich & Hershfield, 1989: 1045-1066; Hershfield & Mitchel, 1995: 1725-1748).

2.3.9. XANTIENURIE

Oorerflike xantienurie is 'n outosomaal resessiewe defek wat veroorsaak word deur 'n defek in die XOD-ensiem. (Chu et al., 1993: 899; Holmes & Wyngaarden, 1989: 1085-1092; Newcombe, 1975: 217-222; Simmonds et al., 1995b: 1781-1793).

'n Derde van die pasiënte wat aan hierdie defek ly, se **simptome** kan direk verbind word met 'n tekort aan XOD, maar die meeste pasiënte is egter asimptomaties. By sommige gevalle kom daar 'n gekombineerde tekort aan XOD en sulfietdehidrogenase voor. Hierdie defek is baie ernstiger en word in Afdeling 2.2.7 bespreek. Naastenby een derde van die pasiënte ontwikkel xantienstene in die urienkanale, terwyl babas met simptomatiese xantienurie-simptome soos irriteerbaarheid, periodieke bloed-urinering (hematurie) en soms oranje-bruin bevlekking van hul doeke vertoon. (Holmes & Wyngaarden, 1989: 1085-1092; Newcombe, 1975: 217-222; Simmonds et al., 1995b: 1781-1793).

Diagnose: Pasiënte met hierdie defek skei uiterste hoeveelhede xantien en hipoxantien in die urine uit met verlaagde vlakke van uriensuur. Xantienstene kan gevorm word. Hierdie stene neem ook verskillende groottes, vorme en kleure aan, maar dit is meestal bruinerig of geel-bruin, glad, rond of ovaalvormig (hoewel onreëlmatige vorme al gevind is) en bros. Xantienstene kan nie met X-strale opgespoor word nie, tensy dit kalsium bevat. (Holmes & Wyngaarden, 1989: 1085-1092; Newcombe, 1975: 217-222; Simmonds et al., 1995b: 1781-1793).

As **behandeling** word die inname van baie vloeistof aanbeveel. Alkalieë wat mondelings ingeneem word, kan nuttig wees, maar oor 'n lang tydperk kan dit egter skadelik wees. 'n Dieet met 'n lae purieninhoud is ook voordelig. Die inname van metielxantiene, byvoorbeeld kafeïen, is egter nie 'n probleem nie, aangesien hierdie verbindings baie meer oplosbaar is as xantien (terwyl dit in elk geval nie deur XOD afgebreek word nie). (Holmes & Wyngaarden, 1989: 1085-1092; Newcombe, 1975: 217-222; Simmonds et al., 1995b: 1781-1793).

2.4. PROBLEEMSTELLING, DOELSTELLING EN BENADERINGSWYSE

Soos in Afdeling 2.3 bespreek is, bestaan daar baie defekte in die purienmetabolisme. Meeste van hierdie het 'n drastiese invloed op die betrokke persoon en sy familie se lewe. Tog is baie van hierdie defekte behandelbaar indien dit betyds opgespoor word, verkieslik voordat simptome begin wys. Die probleem lê dus by die opsporing van hierdie defekte by asimptomatieses lyers. Die beste benadering tot hierdie probleem sou wees om 'n goedkoop, akkurate metode daar te stel wat op 'n roetinebasis gebruik kan word om alle persone, verkieslik pasgebore babas, mee te toets.

Soos in Hoofstuk 4 bespreek sal word, is daar baie maniere waarop bepaal kan word watter defek 'n persoon het. Meeste van hierdie tegnieke is te duur of nie akkuraat genoeg nie. Uit die literatuur is 'n ensimatiese metode gevind, wat deur Jensen (1985: 101-110) beskryf is, wat die potensiaal het om 'n goedkoop maar akkurate metode te vorm waardeur bepaal kan word of 'n persoon 'n defek in sy purienmetabolisme het al dan nie. Hierdie metode is egter nie gestandaardiseer om op urienmonsters gebruik te word nie. Met hierdie studie word daar dus beoog om hierdie ensimatiese kwantifiseringsmetode van totale puriene as siftingsmetode te standaardiseer en te toets.

In verdere hoofstukke sal die metode bespreek word, asook die aanpassing en standaardisering daarvan deur van standarde en urine gebruik te maak. Hierna sal die metode se effektiwiteit om persone met puriendefekte te identifiseer, deur van hul urine gebruik te maak, geëvalueer word. Ten laaste sal daar dan 'n bespreking gegee word van die bruikbaarheid van die metode om as siftingsmetode gebruik te kan word.

HOOFSTUK 3

STANDAARDISERING VAN DIE METODE VIR DIE BEPALING VAN TOTALE PURIENE EN URIENSUUR

3.1. INLEIDING

Daar is verskeie metodes waardeur die konsentrasie van puriene afsonderlik bepaal kan word. Daar is egter slegs een metode, sover bekend, waardeur die totale hoeveelheid puriene in urine en/of ander bronne soos die niere, bloed of standaardoplossings bepaal kan word, naamlik deur dit ensimaties te bepaal. Voordat 'n metode egter aangewend kan word om totale puriene in urine te bepaal, moet sekere faktore wat die metode beïnvloed, eers ondersoek en, indien nodig, gestandaardiseer word. Soos in Hoofstuk 1 genoem, is die doelstelling van hierdie studie om 'n metode vir hierdie doel te standaardiseer wat vinnig, goedkoop en akkuraat is. Met standaardisering van die metode is egter slegs die belangrikste faktore ondersoek. Dit sluit in die pH van die oplossing, die oplosbaarheid van die substrate, die invloed van inhibeerders, die konsentrasie van die ensieme en die temperatuur. Aangesien hierdie studie die metodologie van 'n spesifieke toepassing ondersoek, word daar in hierdie hoofstuk eerstens 'n bespreking gedoen van die bestaande metodes en sekere relevante aspekte daarvan, voordat die eksperimentele werk beskryf word.

3.2 METODES VIR DIE BEPALING VAN DIE HOEVEELHEID PURIENE IN BIOLOGIESE MONSTERS

3.2.1. BEPALING VAN PURIENE AFSONDERLIK

Daar bestaan verskeie metodes en tegnieke waardeur die konsentrasies van puriene afsonderlik bepaal kan word, byvoorbeeld dunlaag-chromatografie (Van Gennip et al., 1994: 142), hoëdruk vloeistofchromatografie (HPLC) (Chu et al., 1993: 899; Dry, 1994: 96-135; Van Gennip et al., 1994: 142), gaschromatografie (GC) (Dry, 1994: 83-95; van

Gennip, 1981: 69-70), en ensimatisiese metodes gekoppel met spektrofotometrie (Coddington, 1965: 502-504; Coddington, 1965: 505-507; Jørgensen, 1965: 495-499; Kalckar, 1947: 429-442; Möllering & Bergmeyer, 1965: 491-494; Newcombe, 1975: 5; Praetorius, 1965: 500-501).

Tegnieke soos HPLC, wat baie sensitief en vinnig (veertig minute vir een analise) is, en wat al die puriene saam kan bepaal, word egter eerder gebruik vir die identifisering van spesifieke defekte in die purienmetabolisme. Die groot nadeel van hierdie tegniek is dat dit duur (R250 per analise) is. Verder is die puriennukleotiede pH-sensitief en kan klein variasies in die pH van die buffers die skeiding van die metaboliëte benadeel. Nog 'n nadeel is dat sommige metaboliëte saam elueer, wat kwantifisering benadeel. Veral inosien is geneig om saam met die interne standaard (allopurinol) te elueer. (Dry, 1994: 138-141). Indien daar egter 'n siftingstegniek verkry kan word wat kan bepaal of 'n puriendefek wel voorkom, al bepaal dit nie watter defek dit is nie, kan HPLC verder gebruik word vir die identifisering van die spesifieke defek, veral indien genoemde probleme uitgeklaar word.

Aangesien die meeste puriene lig maksimaal absorbeer by afsonderlike golflengtes (Coddington, 1965: 502-504; Coddington, 1965: 505-507; Jørgensen, 1965: 495-499; Kalckar, 1947: 429-442; Möllering & Bergmeyer, 1965: 491-494; Praetorius, 1965: 500-501) kan die puriene afsonderlik spektrofotometries bepaal word. Die meeste puriene word gemeet deur die puriene stapsgewys na uriensuur af te breek (sien Afdeling 2.2.4.), maar puriene kan ook onafhanklik van uriensuur gemeet word. (Coddington, 1965: 502-504; Coddington, 1965: 505-507; Jørgensen, 1965: 495-499; Möllering & Bergmeyer, 1965: 491-494; Praetorius, 1965: 500-501). Die golflengtes waarby die verskillende puriene lig absorbeer en die stapsgewyse afbraak van puriene na uriensuur, word in Figuur 3.1 opgesom.

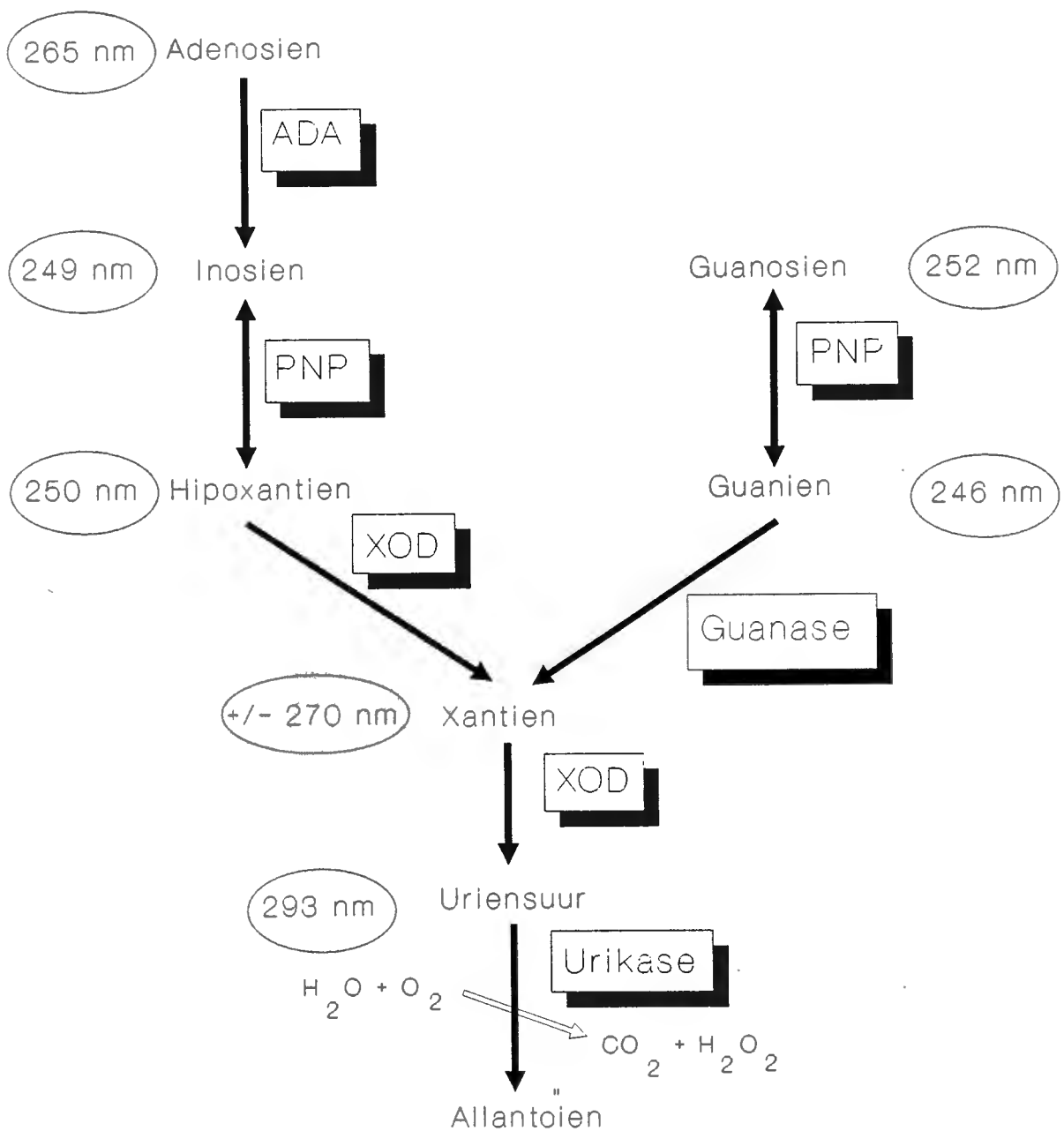
Ensimatiese metodes is meer spesifiek as ander tegnieke, maar vroeër is die benadering slegs gebruik om elke purien afsonderlik te bepaal. Verder is puriene, soos hipoxantien en xantien wat deur dieselfde ensiem, naamlik XOD afgebreek word, gesamentlik bepaal. Daar is egter reeds 'n metode beskryf waardeur die totale hoeveelheid puriene as 'n eenheid bepaal kan word, wat berus op die stapsgewyse ensimatiese afbraak van die puriene soos uiteengesit in Figuur 3.1. (Jensen, 1985: 101-110).

3.2.2. DIE ENSIMATIESE BEPALING VAN DIE TOTALE HOEVEELHEID PURIENE

Aangesien puriene egter in 'n mengsel voorkom, is dit nie moontlik om dit afsonderlik te kwantifiseer nie, aangesien die absorpsiespektra in 'n groot mate oorvleuel (sien Figuur 3.1). Die meeste puriene kan ensimaties stapsgewys afgebreek word na uriensuur, waarna die konsentrasie uriensuur 'n aanduiding sal wees van die totale hoeveelheid puriene wat aanvanklik teenwoordig was.

Die metode wat oorspronklik gebruik is deur Jensen (1985: 101-110), is aangepas en verder verfyn tydens die ondersoek. Hierdie metode is egter oorspronklik gebruik vir die bepaling van die verlies van nie-gefosforileerde purienverbindinge vanuit niere tydens oorplantingsondersoeke. Die metode is nie gestandaardiseer vir gebruik in uriene nie. Die skrywer het wel daarop gedui dat dit wel vir die bepaling van totale puriene in uriene gebruik is, maar geen resultate is getoon nie. (Jensen, 1985: 101-110).

Die metode deur Jensen (1985: 101-110) beskryf, berus op die opeenvolgende ensimatiese transformasies van purien-nukleosiede en bases na uriensuur wat dan deur middel van urikase bepaal kan word (sien Figuur 3.1). Die konsentrasie van die uriensuur wat gevorm het, word bepaal deur die afname in absorbansie by 293 nm te meet nadat die ensiem urikase bygevoeg is. Die reaksies betrokke hierby



Figuur 3.1: Die stapsgewyse afbraak van puriene na urien-suur

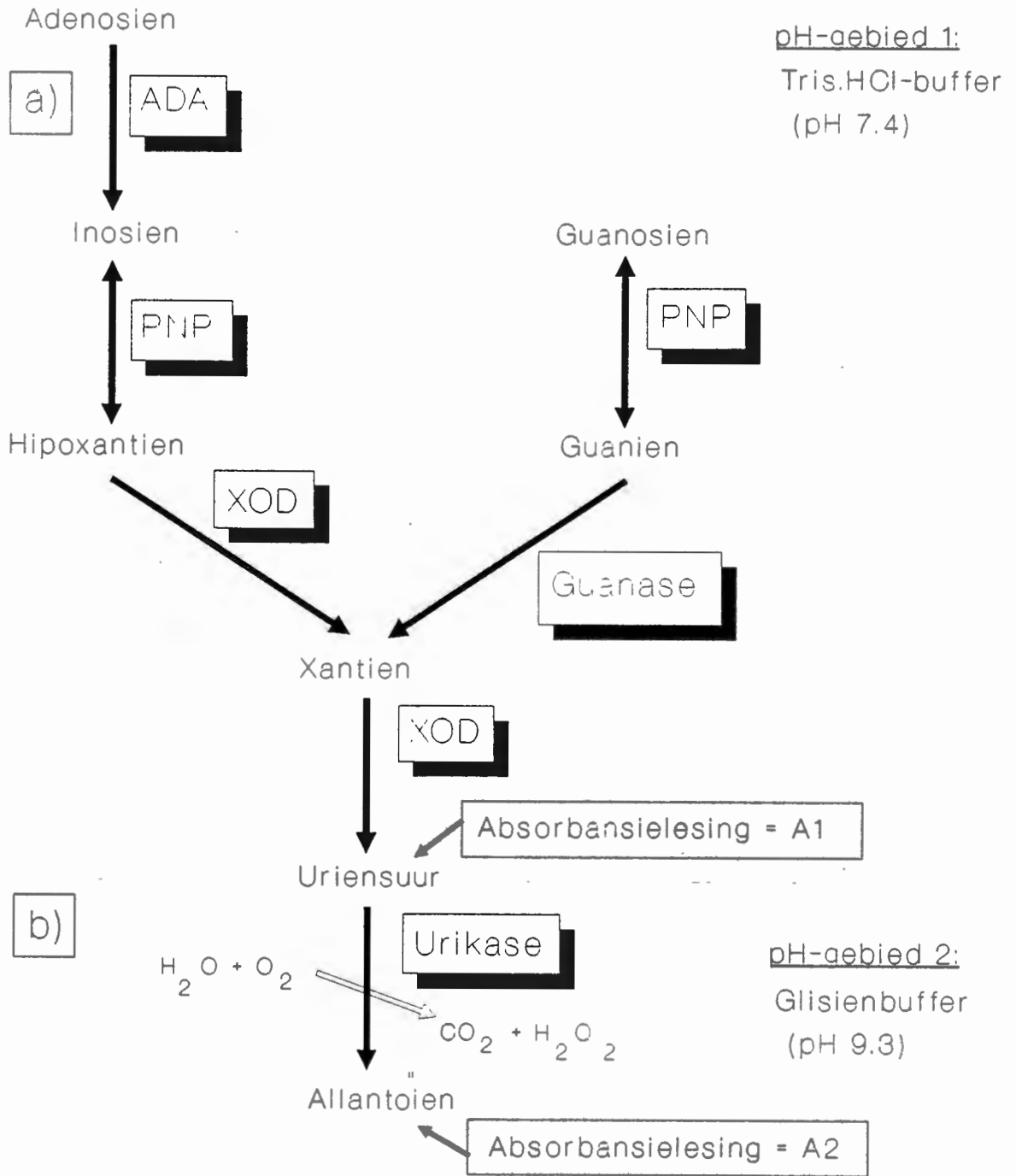
 = ensieme bygevoeg
 = Golflengtes waarby die purien maksimaal absorbeer

asook die toestande waarby dit plaasvind, word in Figuur 3.2 uiteengesit.

Hierdie metode is die enigste ensimatiese metode vir die bepaling van die totale hoeveelheid nie-gefosforileerde puriene. Daar is wel ander metodes (ensimatiese metodes en ander) bekend wat gebruik kan word vir die bepaling van die individuele purienverbindinge (kyk Afdeling 3.2.1). Die grootste voordeel van die metode is dat al die puriennukleosiede in een analise bepaal kan word, in plaas van 'n groot aantal analyses vir die individuele puriene, wat gewoonlik in baie klein hoeveelhede in urine voorkom. 'n Nadeel is dat adenien nie bepaal kan word nie. Dit is egter die enigste bekende nie-gemetileerde puriene wat fisiologies voorkom, wat nie deur die metode bepaal kan word nie. Hierdie purien kom egter slegs in klein hoeveelhede in die urine voor en, sover bekend, hoop dit nie op in die urine by enige puriendefek nie (sien Afdeling 2.2).

Voorvereistes wat gestel is vir die kwantifisering van die totale puriene is 'n totale ensimatiese transformasie van die purienverbindinge na uriensuur en 'n reglynige verhouding tussen die konsentrasie van die nie-gefosforileerde puriene en die waargenome verandering in absorbansie. Jensen (1985: 101-110) het gevind dat 94% tot 98% van die purienverbindinge wat gebruik is, na uriensuur afgebreek is en as sulks gemeet kon word. Verder is 'n reglynige verband tussen die purienkonsentrasie en die waargenome verandering in absorbansie ook gedemonstreer.

Volgens Jensen (1985: 101-110) is dit vir die akkuraatheid van hierdie metode noodsaaklik dat die puriene in die toetsmonster binne 'n konsentrasiegebied van 5 tot 25 $\mu\text{mol/l}$ lê, as gevolg van inhibisie van XOD deur waterstofperoksied (sien Afdeling 3.3.1.).



Figuur 3.2: Stapsgewyse ensimatie transformasie van a) puriene na uriensuur en b) uriensuur na allantoiën. Die twee pH-gebiede (a en b) waarin gewerk is, asook die buffers wat gebruik is en die stadiums waar lesings geneem word, word aangedui.

Die verandering in absorbansie (δA) word bepaal as die verskil tussen die eerste absorbansielesing (A_1) en die tweede absorbansielesing (A_2). Hierdie verandering in absorbansie is direk eweredig aan die konsentrasie van die uriensuur wat gevorm het na afloop van die XOD-reaksie. Die formule wat gebruik word vir die bepaling van die konsentrasie van die totale puriene (met ander woorde die hoeveelheid uriensuur wat gevorm het tydens die eerste reaksies en wat daarna weer afgebreek is na allantoin), word uiteengesit tydens die bespreking van die eksperimentele opstelling (Afdeling 3.3.2.).

Die deteksielimiët van hierdie metode is 1,0 μmol gedefosforileerde purien per liter, en die minimum verandering in absorbansie wat deur die bestaande spektrofotometer (Beckman DU-7500) gemeet kan word, is $\delta A_{293} = 0,005$. Die belangrikste oorsaak vir foute is die moontlikheid van onvolledig ensimatieuse transformasie van die puriene na uriensuur. Die metode is hoogs spesifiek, aangesien slegs uriensuur as substraat vir urikase kan dien.

Tydens die ondersoek is dit belangrik om bewus te wees van die feit dat waterstofperoksied tydens die XOD- en urikase-gekataliseerde reaksies gevorm word (sien Figuur 2.6 en Figuur 3.2), wat die werking van XOD inhibeer. Die invloed van die inhibisie op die reaksie en hoe dit beheer kan word, word in Afdeling 3.3.1 verder bespreek. Ensiembaseerde metodes van analise is dus spesifiek en sensitief en daarom is min of geen monstervoorbereiding nodig nie. Hierdie reaksies vind ook plaas onder betreklik matige toestande en is dus gewoonlik maklik om uit te voer. (Palmer, 1991: 318, 327). Ensieme ondergaan outolise, dus moet korrekte hanteringsprosedures gestandaardiseer en streng gevolg word. Die ensieme is ook gewoonlik duur. Die meeste ensieme word gedenatureer by temperature bo 40°C en by 'n pH onder 5 en bo 9. Hierdie faktore is in ag geneem met die standaardisering van 'n ensimatieuse metode vir die bepaling van totale puriene soos in die daaropvolgende afdeling beskryf word.

3.3 STANDAARDISERING

In hierdie afdeling word die faktore wat in ag geneem is tydens die vestiging van 'n metode vir gebruik as siftingstegniek vir die bepaling van die totale puriene in urine beskryf. Koste en tyd is deurentyd in ag geneem en daar is gepoog om beide te beperk. Vervolgens word die faktore bespreek, waarna daar in die daaropvolgende afdelings getoon word hoe die metode getoets word deur van standarde gebruik te maak.

3.3.1. FAKTORE WAT IN AG GENEEM IS VIR DIE VESTIGING VAN DIE METODE

3.3.1.1. pH

Soos in Afdeling 3.2.2 en Figuur 3.2 aangedui, word in die metode van twee pH-gebiede gebruik gemaak. In die eerste pH-gebied (pH 7.4) word van 'n Tris.HCl buffer (Tris 0,1 mol/l, fosfaat 3 mmol/l en EDTA 3 mmol/l) gebruik gemaak, waarby die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD optimaal werk. Die pH word hierna aangepas na die tweede pH-gebied (pH 9.3) met glisienbuffer (glisien 0,6 mol/l), vir die optimale werking van urikase.

3.3.1.2. DIE SAMESTELLING VAN STANDAARDE: OPLOSBAARHEID

'n Voorvereiste van 'n ensimatiese bepaling is dat die substrate van die ensieme opgelos moet wees in die reaksiemedium en dat dit nie moet presipiteer tydens die reaksie nie. Nadat al die faktore wat die oplosbaarheid van die puriene in die reaksiemengsel kan beïnvloed, soos temperatuur en pH bestudeer is, is tot die gevolgtrekking gekom dat 'n 2 mmol/l oplossing van elke purien opgemaak kan word, deur hipoxantien, xantien, guanien en uriensuur in 0,01 N NaOH en inosien, guanosien en adenosien in dubbel gedistilleerde water op te los. Al die puriene los ook beter op indien dit in 'n waterbad verhit word en liggies geskud of geswaai word totdat al die puriene

opgelos is. Uit hierdie afsonderlike purienoplossings is 'n purienmengsel van 0,1 mmol/l saamgestel. Adenosien, inosien, hipoxantien, xantien en guanien is verkry van BDH, guanosien is verkry van Sigma en uriensuur van Merck.

3.3.1.3. INVLOED VAN INHIBEERDERS

Die belangrikste inhibeerder tydens die ensiemreaksies is waterstofperoksied wat vorm uit water en suurstof tydens die XOD- en urikase-gekataliseerde reaksies. Waterstofperoksied inhibeer die XOD-ensiem. Die invloed van hierdie inhibeerder is die duidelikste waarneembaar by hoë purienkonsentrasies, aangesien meer van die inhibeerder dan gevorm word. (Kalckar, 1947: 426). Dit is belangrik om te bepaal in watter konsentrasiegebied lesings geneem kan word, sonder dat die invloed van die inhibeerder die akkuraatheid van die resultate te veel benadeel. Volgens Jensen (1985: 101-110) is 'n konsentrasiegebied van tussen 5 en 25 $\mu\text{mol/l}$ laag genoeg. Tydens die uitvoer van die ondersoek is ook gepoog om in hierdie konsentrasiegebied te werk.

3.3.1.4. ENSIEMKONSENTRASIES

Die ensieme maak die duurste deel uit van die ondersoek en optimale benutting van die ensieme is dus belangrik vir die bepaling van die koste van die metode. Dit is belangrik dat daar meer as genoeg ensiemaktiwiteit sal wees vir elke stap van die proses om volledig te kan plaasvind sodat volledige substraatverbruik sal plaasvind. Die konsentrasie (ensiemeenhede) van die ensieme bepaal ook die spoed, met ander woorde die tydsverloop, van die reaksie. Daarom is die koste- en tydsfaktore van die metode teen mekaar opgeweeg tydens die bepaling van ensiemkonsentrasies. Daar is dus besluit om 'n ensiemeenheidkonsentrasie van 13,34 U/l onderskeidelik van ADA, PNP en XOD te gebruik, wat beteken dat daar in een ml genoeg ensiem is om 13,34 nmol van die onderskeie substrate in een mi-

nuut na produkte om te skakel. Gegewe 'n konsentrasiegebied van 5 tot 25 $\mu\text{mol/l}$, wat as 5 tot 25 nmol/ml beskou kan word, is hierdie ensiemkonsentrasies in die tyd wat die eksperiment verloop, meer as genoeg om produkvorming te bewerk-stellig. Die ensiemenheidkonsentrasie van guanase is 0,74 U/l, terwyl urikase se konsentrasie as 12 U/l by 25°C of 29,34 U/l by 37°C vasgestel is. Hierdie ensiemkonsentrasies bied ook meer as voldoende aktiwiteit. ADA, PNP, XOD en urikase is verkry van Boehringer Mannheim en guanase is van Sigma verkry.

3.3.1.5. TEMPERATUUR

Al die ensiemreaksies verloop vinniger by 37°C as by kamertemperatuur. Die reaksies is uitgevoer in 'n temperatuurregulerende eenheid wat aan die spektrofotometer (Beckman DU-7500) gekoppel is.

3.3.2. DIE EKSPERIMENTELE OPSTELLING

Na inagneming van die genoemde faktore is 'n eksperimentele opstelling aanvanklik daargestel en getoets. Die reaksiemengsel wat gebruik is vir die bepaling van die totale puriene in afsonderlike purienstandaarde of -mengsels is in Tabel 3.1 opgesom. Die totale volume van die reaksiemengsel is 1 ml. Die golflengte waarby alle lesings geneem is, is 293 nm. 'n Kwarts-kuvet is gebruik, met 'n ligpad van 1 cm. Die temperatuur waarby die ondersoek uitgevoer is, is 37°C. Die blanko waarteen lesings gemeet is, is dubbel gedistilleerde water.

Die reaksiemengsel is saamgestel deur eerstens 'n hoeveelheid standaard purienoplossing of -mengsel te verdun met 'n hoeveelheid water totdat dit 'n totaal van 650 μl opmaak. Die spesifieke hoeveelhede van die purienoplossings of -mengsel het afgehang van die purienkonsentrasie wat verlang word. Hierna is 150 μl Tris.HCl buffer bygevoeg om die pH van die reaksie na 7.4 aan te pas. Hierna is 2 μl elk van die ensieme ADA, PNP, guanase en

Tabel 3.1: Die eksperimentele opstelling van die reaksiesamestelling, wat gebruik is vir die bepaling van die totale puriene en uriensuur in standaard purienoplossings en -mengsels.

Reagens	Volume (in ul)	Eindkonsentrasie
Purienstandaarde plus water	650	0 tot 50 $\mu\text{mol/l}$
Tris.HCl buffer (Tris 0,1 mol/l, fosfaat 3 mmol/l, EDTA 3 mmol/l; pH 7.4)	150	15 mmol/l
ADA (6,67 U/ml)	2	13,34 U/l
PNP (6,67 U/ml)	2	13,34 U/l
Guanase (0,37 U/ml)	2	0,74 U/l
XOD (6,67 U/ml) (of ensiëmmengsel)	2 (8)	13,34 U/l
Meng en inkubeer by 37°C, en volg die reaksie by 293 nm totdat geen verdere toename in absorbaneie waargeneem word nie.		
Glisienbuffer (glisien 0,6 mol/l; pH 9.3)	190	114 mmol/l
Meng en bepaal die absorbaneielesing (A1)		
Urikase (6 U/ml by 25°C, 14,67 U/ml by 37°C)	2	29,34 U/l
Meng, volg die reaksie totdat geen verdere afname in absorbaneielesing meer waargeneem word nie. Bepaal absorbaneielesing (A2)		

Bereken die verandering in absorbaneie en die konsentrasie van die purien(e) soos volg:

$$c = \frac{\delta A \times 10^3}{\epsilon \times d} = \frac{\delta A \times 10^3}{1.25 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{mm}^{-1} \times 10 \text{ mm}}$$

$$= \delta A \times 80 \mu\text{mol/l}$$

waar c: konsentrasie in die kuvet ($\mu\text{mol/l}$)

δA : verandering in absorbaneie by 293 nm = A1-A2

ϵ : ekstinksiekoëffisiënt van uriensuur

$$= 1.25 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{mm}^{-1}$$

d: sellengte = 10 mm

XOD afsonderlik stapsgewys by die reaksiemengsel gevoeg, waarna die reaksiemengsel telkens gemeng en elke afsonderlike reaksie toegelaat word om voltooi te word. Alternatiewelik is die genoemde vier ensieme saam as 'n ensiommengsel by die reaksiemengsel gegooi en gemeng.

In die gevalle waar die ensieme afsonderlik stapsgewys by die reaksiemengsel gevoeg is, is elke reaksie gevolg by die golflengte waar die bepaalde metabool lig absorbeer (sien Figuur 3.1) deur telkens 'n golflengteskandering tussen 200 nm en 400 nm te doen, om seker te wees dat al die puriene na uriensuur omgeskakel is. In die gevalle waar die ensieme as 'n ensiommengsel bygevoeg is, is die gesamentlike reaksie noukeurig gevolg by 293 nm, waar uriensuur lig absorbeer. Hierna is die pH van die reaksiemengsel na 9.3 verstel deur die byvoeging van 190 μ l glisienbuffer, deeglik gemeng en die eerste absorbandsielesings geneem. Drie lesings is telkens geneem, waarvan die gemiddeld (A1) gebruik is. Hierna is 2 μ l urikase bygevoeg en die reaksie is gevolg totdat dit voltooi is. In hierdie geval is ook drie finale absorbandsielesings geneem, die gemiddeld bepaal, wat hierna as die A2-lesing bekend gestaan het.

Die verandering in die absorbandsie (δA) is dan bereken as die verskil tussen die twee absorbandsielesings, terwyl die konsentrasie puriene bereken is deur gebruik te maak van 'n formule soos uiteengesit in Tabel 3.1.

Volgens Jensen (1985: 101-110) moet die mate waarin urikase lig absorbeer (A_{Urikase}) by 293 nm ook bepaal word, aangesien dit die verandering in absorbandsielesing by 293 nm kan beïnvloed, aangesien die ensiem bygevoeg word na die neem van die eerste lesing (A1). A_{Urikase} is bepaal deur die reaksiemengsel op te maak met dubbel gedistilleerde water in die plek van die purienstandaard en Tris.HCl-buffer in die plek van die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD. Die gemiddelde A_{Urikase} wat so bepaal is, is gelyk aan 0,005, wat gelyk is aan die deteksielimiet

van die spektrofotometer. Die invloed van urikase kan dus geïgnoreer word. Die invloed van die ander ensieme hoef nie bepaal te word nie, aangesien dit voor die bepaling van die twee absorpsielesings (A1 en A2) bygevoeg is.

3.3.3. STANDAARDREEKSE

Om die substraatkonsentrasiegebied waarbinne daar 'n reglynige verband tussen die berekende en ware purienkonsentrasies bestaan vas te stel, is konsentrasiereekse opgestel. Hierdie reekse het bestaan uit 'n purienmengsel van adenosien, inosien, guanosien, guanien, hipoxantien en xantien van dieselfde konsentrasies. 'n Reeks is ook vir uriensuur alleen opgestel. Vir beide reekse is die totale konsentrasie waarmee gewerk is in die gebied vanaf 0 tot 50 $\mu\text{mol/l}$. Hierdie konsentrasies is gekies, na aanleiding van die invloed van inhibisie van XOD deur waterstofperoksied (sien Afdeling 3.3.1). Jensen (1985: 101-110) het voorgestel dat die maksimum konsentrasie ongeveer 25 $\mu\text{mol/l}$ behoort te wees.

Die reaksies is saamgestel en in tripliikaat uitgevoer soos uiteengesit in Tabel 3.1. Tydens die bepaling van die konsentrasiereekse is die ensiimmengsel as 'n eenheid bygevoeg. Tydens die uitvoering van die konsentrasiereeks vir uriensuur, is die 8 μl ensiimmengsel met 8 μl Tris.HCl-buffer vervang.

Die resultate van die konsentrasiereekse vir die purienmengsel en uriensuur word in Figuur 3.3 uiteengesit. In Tabel 3.2 word die eksperimenteel-berekende waardes vir die reeks, die gemiddeld en standaard afwyking van die gemiddelde, aangedui en vergelyk met die teoretiese (werklike) waardes.

Uit hierdie data is die mate van ooreenstemming tussen die eksperimentele en die teoretiese waardes (absorpsiewaardes) bepaal en is die persentasie waartoe eersgenoemde waarde afwyk van die teoretiese waarde,

bepaal. Uit die resultate vir die purienmengsel is waargeneem dat die reaksie wel in 'n mate (veral vanaf 0 tot 10 $\mu\text{mol/l}$, maar ook redelik tot ongeveer 20 $\mu\text{mol/l}$) 'n reglynige verloop het, maar dat hierdie reglynige verband afneem by hoër konsentrasies. Dit dui daarop dat die sensitiwiteit van die bepaling afneem, moontlik as gevolg van die toename in die vorming van waterstofperoksied wat die XOD inhibeer by hoër konsentrasies. Die beste resultate is in die gebied 0 tot 10 $\mu\text{mol/l}$ (100% tot 92% ooreenstemming) verkry, alhoewel daar tot by die konsentrasie van 50 $\mu\text{mol/l}$ 'n 87% ooreenstemming met die teoretiese waarde was.

Uit die konsentrasiereeks vir uriensuur is waargeneem dat die reaksie wel meer reglynig verloop in vergelyking met die puriene en dat die mate van ooreenstemming met teoretiese waardes heelwat groter is as dié van puriene. In die geval van die uriensuurreeks is 'n ooreenstemming van 90% selfs by 50 $\mu\text{mol/l}$ waargeneem.

'n Faktor wat in berekening geneem moet word, is dat die puriene nooit 100% akkuraat afgeweg, oorgedra en opgelos kan word nie, al word dit teoreties so beskou. Afwykings van die teoretiese waardes kan dus ook wees as gevolg van eksperimentele veranderlikes.

3.3.4. BEPALING VAN DIE KONSENTRASIES VAN DIE ONDERSKEIE PURIENE IN STANDAARDOPLOSSINGS.

Die groot nadeel by die gebruik van 'n purienmengsel om te bepaal of die ensimatisiese transformasie van die puriene na uriensuur ten volle plaasvind, is die moontlikheid dat een van die puriene dalk nie ten volle afgebreek word na die daaropvolgende purien nie. Aangesien 'n mengsel van puriene gebruik word, waar die bepaalde purien slegs 'n klein deel van die mengsel verteenwoordig, kan onvolledige transformasie van 'n enkele purien maklik gemis word. Dit is ook moontlik dat een of meer van die puriene langer neem om afgebreek te word na

Tabel 3.2: Purien- en uriensuur standaardreeks.

Konsentrasie ($\mu\text{mol/l}$)	Teoretiese δA	Totale Puriene	Uriensuur
0,0	0,00	0,00 $\pm$ 0,00 (100% $\pm$ 0%)	0,00 $\pm$ 0,00 (100% $\pm$ 0)
2,5	0,03	0,03 $\pm$ 0,01 (100% $\pm$ 33%)	0,03 $\pm$ 0,00 (100% $\pm$ 0%)
5,0	0,06	0,06 $\pm$ 0,01 (100% $\pm$ 17%)	0,05 $\pm$ 0,01 (83% $\pm$ 17%)
7,5	0,09	0,09 $\pm$ 0,01 (100% $\pm$ 11%)	0,09 $\pm$ 0,01 (100% $\pm$ 11%)
10,0	0,13	0,12 $\pm$ 0,02 (92% $\pm$ 15%)	0,11 $\pm$ 0,01 (85% $\pm$ 8%)
12,5	0,16	0,13 $\pm$ 0,02 (81% $\pm$ 13%)	0,14 $\pm$ 0,01 (88% $\pm$ 6%)
15,0	0,19	0,17 $\pm$ 0,02 (89% $\pm$ 11%)	0,18 $\pm$ 0,01 (95% $\pm$ 5%)
17,5	0,22	0,19 $\pm$ 0,03 (86% $\pm$ 14%)	0,21 $\pm$ 0,01 (95% $\pm$ 5%)
20,0	0,25	0,22 $\pm$ 0,03 (88% $\pm$ 12%)	0,24 $\pm$ 0,01 (96% $\pm$ 4%)
22,5	0,28	0,24 $\pm$ 0,04 (86% $\pm$ 14%)	0,26 $\pm$ 0,01 (93% $\pm$ 4%)
25,0	0,31	0,27 $\pm$ 0,04 (87% $\pm$ 13%)	0,30 $\pm$ 0,01 (97% $\pm$ 3%)
27,5	0,34	0,29 $\pm$ 0,04 (85% $\pm$ 12%)	0,32 $\pm$ 0,02 (94% $\pm$ 6%)
30,0	0,38	0,31 $\pm$ 0,04 (82% $\pm$ 11%)	0,36 $\pm$ 0,01 (95% $\pm$ 3%)
32,5	0,41	0,35 $\pm$ 0,05 (85% $\pm$ 12%)	0,38 $\pm$ 0,01 (93% $\pm$ 2%)
35,0	0,44	0,40 $\pm$ 0,05 (91% $\pm$ 11%)	0,41 $\pm$ 0,02 (93% $\pm$ 5%)
37,5	0,47	0,42 $\pm$ 0,06 (89% $\pm$ 13%)	0,44 $\pm$ 0,03 (94% $\pm$ 6%)

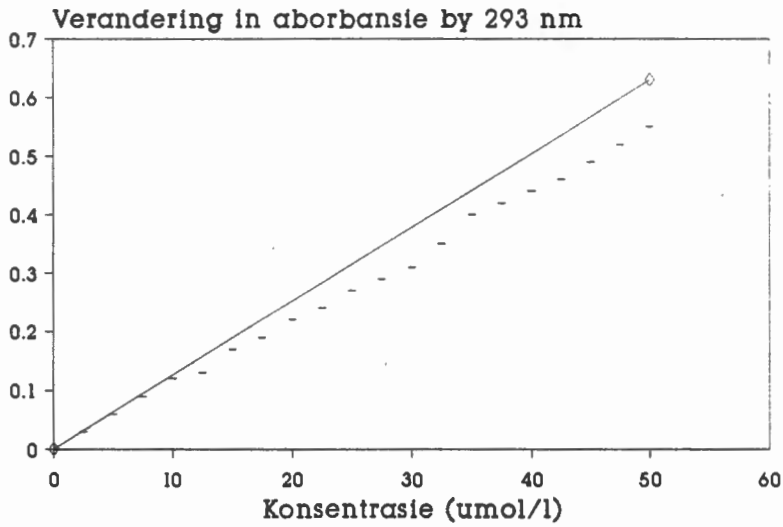
Tabel 3.2: (vervolg).

Konsentrasie ($\mu\text{mol/l}$)	Teoretiese δA	Totale Puriene		Uriensuur
40,0	0,50	0,44	$\pm 0,07$	$0,47 \pm 0,03$
		(88%	$\pm 14\%$)	(94% $\pm 6\%$)
42,5	0,53	0,46	$\pm 0,07$	$0,50 \pm 0,01$
		(87%	$\pm 13\%$)	(94% $\pm 2\%$)
45,0	0,56	0,49	$\pm 0,08$	$0,52 \pm 0,02$
		(87%	$\pm 14\%$)	(93% $\pm 4\%$)
47,5	0,59	0,52	$\pm 0,07$	$0,55 \pm 0,02$
		(88%	$\pm 12\%$)	(93% $\pm 3\%$)
50,0	0,63	0,55	$\pm 0,09$	$0,57 \pm 0,03$
		(87%	$\pm 14\%$)	(90% $\pm 5\%$)

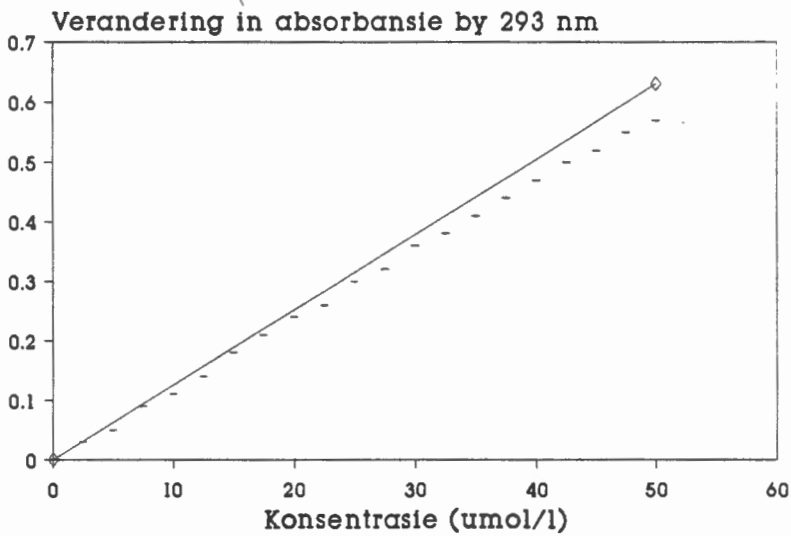
Die eksperimenteel-berekende verandering in absorban-siewaardes, naamlik die gemiddelde en standaardafwy-king van die gemiddelde, word saam met die teoretiese waardes vir elke konsentrasie aangedui. In hakies word ook die persentasie-ooreenstemming tussen die eksperi-mentele waardes, naamlik die gemiddelde en stan-daardafwyking, en die teoretiese waardes aangedui. (Beide die eksperimentele en die teoretiese waardes is bereken as verandering in absorbandsie by 293 nm.). (Sien Figuur 3.3).

die daaropvolgende purien as die ander. Aangesien puriene slegs in 'n klein hoeveelheid in die standaardmengsel (en moontlik ook in normale urine) voorkom kan dit dalk wel in die beskikbare tyd na uriensuur afgebreek word. Indien dit egter in 'n groter hoeveelheid voorkom, byvoorbeeld by 'n defek waar die purien(e) ophoop, bestaan die moont-likheid dat dit nie volledig afgebreek kan word deur die voorgestelde metode wat in Afdeling 3.3.3 beskryf is nie. Om dus seker te maak dat elk van die ses puriene en

A) Konsentrasiereeks: Totale Puriene



B) Konsentrasiereeks: Uriensuur



Figuur 3.3: Purien en uriensuur standaardreeks. 'n Purien-mengsel (A) en uriensuur (B) standaardreeks is saamgestel en eksperimenteel gekwantifiseer soos in Afdeling 3.3.3 beskryf is.

is.   Teoretiese waardes
- Eksperimentele waardes

uriensuur wel ten volle getransformeer word deur hul onderskeie ensiemreaksies, is die eksperimentele opstelling (sien Tabel 3.1) gebruik met elke purien afsonderlik as substraat. 'n Hoë konsentrasie van elke purien is gebruik, naamlik $50 \mu\text{mol/l}$, om te bepaal of hierdie hoë konsentrasie van elke purien binne die gegewe tyd deur die aparte ensieme of die ensiemmengsel omvorm kan word na die onderskeie produkte van die ensieme.

Die konsentrasies van die puriene adenosien, inosien, xantien, guanosien, guanien en uriensuur, is eenmalig bepaal, waar die ensieme (ADA, PNP, guanase en XOD) afsonderlik stapsgewys bygevoeg is, in plaas van 'n ensiemmengsel (sien Tabel 3.1). Hierdie bepaling is slegs een keer gedoen om te bepaal of die puriene wel deur hul on-

derskeie ensieme afgebreek word. Hierna is die konsentrasies van die puriene adenosien, inosien, hipoxantien, xantien, guanosien en guanien, asook 'n purienmengsel twee keer bepaal, waar die ensiemmengsel as 'n eenheid gebruik is. Net soos by die bepaling van die konsentrasiereekse, is die gemiddeld en die standaardafwyking van die gemiddeld van die eksperimenteel-berekende waardes bereken (sien Afdeling 3.3.3). Die reaksie is van die begin af, net voor die eerste ensiem(e) bygevoeg is, gemonitor.

Die rede waarom die eerste vier ensieme eers afsonderlik stapsgewys bygevoeg is, is om te verseker dat elke purien wel opeenvolgens na die daaropvolgende purien afgebreek word, en dat die ensiemmengsel wel die puriene volledig afbreek na uriensuur. 'n Golflengte-skandering is telkens gedoen, in plaas daarvan om slegs die lesing by een golflengte (293 nm) op 'n bepaalde tyd te neem, sodat daar nie net duidelik waargeneem kan word hoe uriensuur eers vorm en dan afgebreek word nie, maar ook watter ander puriene óf afgebreek word óf gevorm word.

Twee blanko's is ook gebruik waar die standaard vervang is met dubbel gedistilleerde water en die reaksies verder dieselfde verloop het. By die eerste blanko is die eerste vier ensieme afsonderlik stapsgewys bygevoeg en by die tweede blanko is hulle saam as 'n eenheid bygevoeg. Die doel van die blanko was om die effek van die ensieme op die absorbansiewaardes te bepaal, aangesien ensieme ook moontlik 'n bydrae mag lewer tot absorpsie by 293 nm, weens die teenwoordigheid van aromatiese aminosure. Geen merkbare verandering in absorbansie is waargeneem nie.

Om die lengte van die hoofstuk te beperk, word die resultate van enkele afsonderlike bepalinge in Bylae A uiteengesit, terwyl die samevattende resultate verder in hierdie afdeling beskryf word.

Tydens die bepaling van die konsentrasies van die puriene adenosien, inosien, xantien en guanosen deur die ensieme ADA, PNP, XOD en guanase apart by te voeg, is gevind dat die reaksies gekataliseer deur ADA en PNP binne 5 minute en XOD binne 5 tot 15 minute voltooi is. Daar is egter na die bepaling van die konsentrasie van guanosen gevind dat die hoeveelheid guanase wat by die reaksie gevoeg is, te min is. Die guanase-gekataliseerde reaksie het langer as 60 minute geduur, en die verandering in absorbansiewaarde het steeds bly toeneem. Dit kan moontlik 'n bydrae lewer tot die effens laer waardes wat in die voorafgaande afdeling (Afdeling 3.3.3) waargeneem is. Die konsentrasie guanase wat in die eksperimentele opstelling gebruik word, moet dus vermeerder word. Die probleem is egter dat die guanase die duurste ensiem is. Die spesifieke aktiwiteit van die ensiem is ook betreklik laag (1,1 U/l). Daar is besluit om meer van die guanase en verder ook meer XOD te gebruik. Indien die XOD-gekataliseerde reaksie (wat soos reeds aangedui die snelheidsbepalende stap in die reaksie is) vinniger verloop, kan dit die totale reaksietyd aansienlik versnel. Omdat die XOD-ensiem die goedkoopste ensiem is, het dit nie 'n groot koste-implikasie tot gevolg nie.

Die verbeterde reaksiesamestelling wat verder gebruik is vir die bepaling van die afsonderlike puriene, word in Tabel 3.3 uiteengesit. Die enigste aanpassing wat gemaak is van Tabel 3.1 is die verhoging van guanase (4,4 U/l) en XOD (40 U/l) in die reaksie. Die resultate van al die bepalinge word in Tabel 3.4 en Figuur 3.4 opgesom. (Vir al drie bepalinge van guanosien, die laaste twee bepalinge van guanien en die laaste bepaling van die purienmengsel, is van die nuwe reaksiesamestelling gebruik gemaak.)

Uit die resultate is waargeneem dat daar geen verskil is wanneer die eerste vier ensieme as 'n eenheid of afsonderlik bygevoeg is nie. Uit die persentasie-ooreenstemming met die teoretiese waarde is waargeneem dat al die puriene, met die uitsondering van hipoxantien, guanosien en die purienmengsel, 'n persentasie-ooreenstemming van hoër as 90% het. Daar is afgelei dat die mate waarin hierdie puriene omgeskakel word na uriensuur en die mate waarin die hoeveelheid uriensuur gemeet kan word, selfs by 50 $\mu\text{mol/l}$, hoog is, en dat dit onafhanklik is daarvan of die ensieme afsonderlik of as 'n eenheid bygevoeg is. Daar kan ook, soos in Afdeling 3.3.3 bespreek is, in gedagte gehou word dat die werklike purienkonsentrasie, wat as 50 $\mu\text{mol/l}$ beskou word, moontlik in werklikheid laer kan wees as gevolg van eksperimentele veranderlikes, soos onvolledige oplosbaarheid van die substrate.

Daar moet verder in ag geneem word dat daar tydens die bepaling van die konsentrasies van die afsonderlike puriene met 'n betreklik hoë konsentrasie (50 $\mu\text{mol/l}$) gewerk is. Tydens die bepaling van die standaardreeks (Afdeling 3.3.3) is dit reeds bepaal dat wanneer so 'n hoë konsentrasie (50 $\mu\text{mol/l}$) gebruik is, die resultate wat verkry is 'n $87\% \pm 14\%$ (sien Tabel 3.2) ooreenstemming met die teoretiese waarde gehad het. Hierteenoor was die persentasie-ooreenstemming met die teoretiese waarde hoër by laer konsentrasies.

Tabel 3.3: Die aangepasde reaksiesamestelling vir die bepaling van totale puriene en uriensuur.

Reagens	Volume (in μl)	Eindkonsentrasie
Purienstandaarde plus water	650	0 tot 50 $\mu\text{mol/l}$
Tris.HCl buffer (Tris 0,1 mol/l, fosfaat 3 mmol/l, EDTA 3 mmol/l; pH 7.4)	150	15 mmol/l
ADA (6,67 U/ml)	2	13,34 U/l
PNP (6,67 U/ml)	2	13,34 U/l
Guanase (1,1 U/ml)	4	4,40 U/l
XOD (20,0 U/ml) (of ensiemmengsel)	2 (10)	40,0 U/l
Meng en inkubeer by 37°C , en volg die reaksie by 293 nm totdat geen verdere toename in absorbaneie waargeneem word nie.		
Glisienbuffer (glisien 0,6 mol/l; pH 9.3)	190	114 mmol/l
Meng en bepaal die absorbaneielesing (A1)		
Urikase (6 U/ml by 25°C , 14,67 U/ml by 37°C)	2	29,34 U/l
Meng, volg die reaksie totdat geen verdere afname in absorbaneielesing meer waargeneem word nie. Bepaal absorbaneielesing (A2)		

Bereken die verandering in absorbaneie en die konsentrasie van die purien(e) soos volg:

$$c = \frac{\delta A \times 10^3}{\epsilon \times d} = \frac{\delta A \times 10^3}{1.25 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{mm}^{-1} \times 10 \text{ mm}}$$

$$= \delta A \times 80 \mu\text{mol/l}$$

waar c: konsentrasie in die kuvet ($\mu\text{mol/l}$)

δA : verandering in absorbaneie by 293 nm = A1-A2

ϵ : ekstinksiëkoëffisiënt van uriensuur
= $1.25 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{mm}^{-1}$

d: sellengte = 10 mm

Tabel 3.4: Kwantifisering van die afsonderlike puriene.

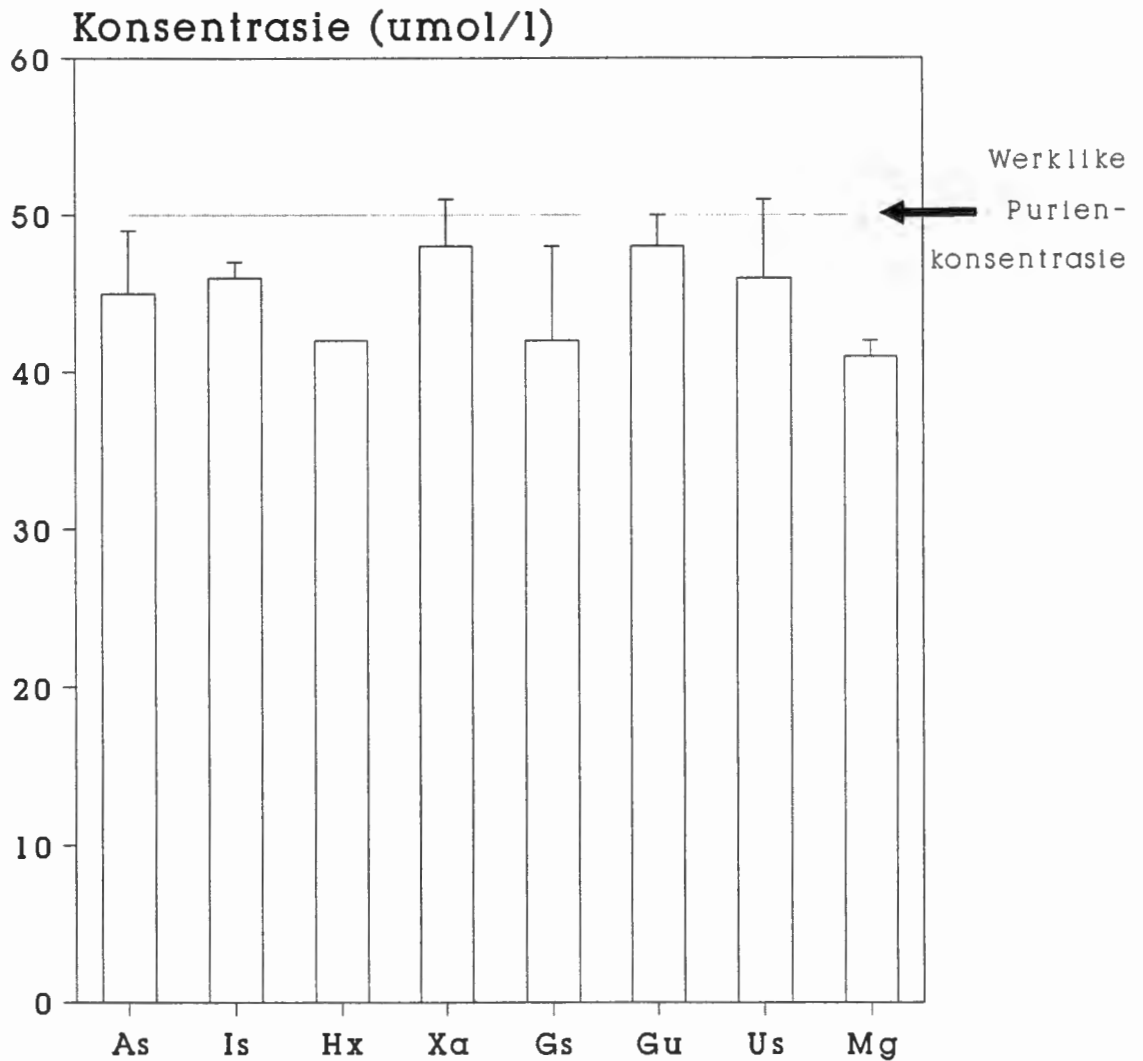
Purien	nommer	konsentrasie		
Adenosien	1 *	50		
	2	44		
	3	42		
	Gemiddeld	45	±	4
	% ooreenstemming	(90%	±	8%)
Inosien	1 *	45		
	2	46		
	3	46		
	Gemiddeld	46	±	1
	% ooreenstemming	(92%	±	2%)
Hipoxantien	1	42		
	2	42		
	Gemiddeld	42	±	0
	% ooreenstemming	(84%	±	0%)
Xantien	1 *	44		
	2	50		
	3	49		
	Gemiddeld	48	±	3
	% ooreenstemming	(96%	±	6%)
Guanosien	2	38		
	3	47		
	Gemiddeld	42	±	6
	% ooreenstemming	(84%	±	12%)
Guanien	1 *	47		
	2	50		
	3	48		
	Gemiddeld	48	±	2
	% ooreenstemming	(96%	±	4%)

Tabel 3.4: (vervolg).

Purien	nommer	konsentrasie		
Uriensuur	1 *	43		
	2 *	50		
	Gemiddeld	46	±	5
	% ooreenstemming	(92%	±	10%)
Purien- mengsel	1	40		
	2	42		
	Gemiddeld	41	±	1
	% ooreenstemming	(82%	±	2%)
Blanko-	1 *	0		
	2	0		
	Gemiddeld	0	±	0
	% ooreenstemming	(0%	±	0%)

Die berekende konsentrasie vir elke konsentrasiebepaling, sowel as die gemiddeld en standaardafwyking van die gemiddeld van al die konsentrasiebepalings vir elke purien afsonderlik of in 'n mengsel, word aangedui. In hakies word ook die persentasie-ooreenstemming met die teoretiese waarde (50 $\mu\text{mol/l}$) aangedui.

(* : die herhalings waarby die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD afsonderlik stapgewys by die reaksiemengsel bygevoeg is)



Figuur 3.4: Bepaling van afsonderlike purienstandaarde deur gebruik te maak van die gestandaardiseerde metode.

Die volgende afkortings is in die figuur gebruik vir die purienstandaarde:

As: Adenosien	Is: Inosien
Hx: Hipoxantien	Xa: Xantien
Gs: Guanosen	Gu: Guanien
Us: Uriensuur	Mg: Purienmengsel

Uit Tabel 3.4 blyk dit dat die resultate verkry tydens die bepaling van die konsentrasies van adenosien, inosien, xantien en guanien afsonderlik 'n hoër persentasie-ooreenstemming met die teoretiese waarde het as die purienmengsel. Hierteenoor het die persentasie-ooreenstemming met die teoretiese waarde vir die bepaling van hipoxantien en guanosien binne die grense geval van die waardes verkry vir die purienmengsel.

3.4. BESPREKING

In hierdie hoofstuk is beskryf hoe 'n ensimatiese metode vir die bepaling van totale puriene en uriensuur, waarvan die raamwerk uit die literatuur verkry is, geëvalueer is as 'n werkbare metode vir die bepaling van die totale puriene en uriensuur in standaardoplossings. Faktore wat in ag geneem is, is pH, oplosbaarheid van substrate, die invloed van inhibeerders, ensiemkonsentrasie en temperatuur.

Standaardreeks is opgestel (Afdeling 3.3.3) vir 'n purienmengsel, sowel as vir uriensuur. Uit die standaardreeks is bepaal dat die bepaling van totale puriene die beste geskied in 'n konsentrasiegebied 0 tot 10 $\mu\text{mol/l}$, aangesien hierdie konsentrasies 'n 100% tot 92% ooreenstemming met teoretiese waardes het. Tot by 'n konsentrasie van 50 $\mu\text{mol/l}$ kan dit ook redelik akkuraat bepaal word, aangesien hierdie konsentrasies 'n 87% ooreenstemming met teoretiese waardes het. Uit die standaardreeks is ook bepaal dat uriensuur akkuraat bepaal kan word oor die hele konsentrasiegebied (0 tot 50 $\mu\text{mol/l}$), aangesien dit selfs by 50 $\mu\text{mol/l}$ 'n 90% ooreenstemming met die teoretiese waardes het.

In Afdeling 3.3.4 is beskryf hoe die hoeveelhede van die afsonderlike puriene met hoë konsentrasies (50 $\mu\text{mol/l}$) van elk bepaal is. Hieruit is afgelei dat die reaksies gekataliseer deur die ensieme ADA, PNP, XOD en urikase binne 'n aanvaarbare tydsverloop (5 tot 15 minute)

voltooi is, maar die reaksie gekataliseer deur guanase, het te stadig (langer as 60 minute) verloop indien hoë guanosien teenwoordig was. Die reaksiesamestelling is daarom aangepas (sien Tabel 3.3) en die reaksie gekataliseer deur hierdie ensiem het hierna vinniger verloop. Dit het egter by hoë konsentrasies guanosien nog steeds te stadig verloop, maar om die hoeveelheid guanase verder aan te pas, sou nie koste-effektief wees nie. Selfs by so 'n hoë konsentrasie het al die puriene behalwe hipoxantien, guanosien en die purienmengsel 'n persentasie-ooreenstemming van hoër as 90% met die teoretiese gehad. Daar is ook verder bepaal dat ADA, PNP, guanase en XOD hul onderskeie reaksies ewe suksesvol kataliseer, ongeag of dit as eenheid of afsonderlik stapsgewys bygevoeg is.

Uit die resultate is afgelei dat die metode soos beskryf, aangepas en geëvalueer in hierdie hoofstuk, geskik is om te gebruik om puriene en uriensuur in urine te bepaal. Dit word vervolgens in Hoofstuk 4 beskryf.

HOOFSTUK 4

DIE ENSIMATIESE BEPALING VAN TOTALE PURIENE EN URIENSUUR IN DIE URINE VAN KONTROLEPERSONE EN PERSONE MET RELEVANTE METABOLIESE DEFEKTE

4.1. INLEIDING

Die metode vir die bepaling van totale puriene en uriensuur wat gestandaardiseer is soos in Hoofstuk 3 beskryf, is aangepas vir die bepaling van totale puriene en uriensuur in urine en word in hierdie hoofstuk beskryf.

Een groot verskil tussen die bepaling van die totale puriene in standaardoplossings (Hoofstuk 3) en die bepaling daarvan in urine, is uiteraard dat die konsentrasie van die puriene nie vooraf bekend is nie. Volgens Newcombe (1975: 6) is die normale uriensuurkonsentrasie in serum onder 5 mg per 100 ml ($\pm 297,4 \mu\text{mol/l}$) vir vroue en onder 6 mg per 100 ml ($\pm 356,9 \mu\text{mol/l}$) vir mans, terwyl die uriensuurkonsentrasie vir beide geslagte normaalweg bo 3 mg per 100 ml ($\pm 178,4 \mu\text{mol/l}$) is. Aangesien urine normaalweg 'n meer gekonsentreerde purien- en uriensuurkonsentrasie bevat as die gebied wat geteiken is vir die optimale bepaling van purienkonsentrasie (0 tot $25 \mu\text{mol/l}$) (Jensen, 1985: 101-110), is dit nodig dat 'n verdunningsreeks van urine saamgestel word om te verseker dat hierdie gebied wel bereik word. Verdere oorwegings vir die bepaling van puriene in urine is die invloed van faktore in die urine self wat 'n invloed op die resultate mag hê asook die wyse waarop waardes tussen verskillende urienmonsters met mekaar vergelyk word. Al hierdie faktore word vervolgens in verdere afdelings beskryf en bespreek.

4.2. DIE STANDAARDISERING VAN DIE METODE VIR DIE BEPALING VAN TOTALE PURIENE EN URIENSUUR IN URINE

4.2.1. INLEIDING

Vir die bepaling van totale puriene en uriensuur in urine is dit baie belangrik dat totale puriene apart van uriensuur bepaal word, aangesien die totale puriene gewoonlik in baie kleiner konsentrasies voorkom, in vergelyking met uriensuur. Volgens Jørgensen (1965:498) byvoorbeeld is die hipoxantien plus xantienkonsentrasie een tiende tot een twintigste van die uriensuurkonsentrasie. Indien die totale puriene en uriensuur saam bepaal sou word, sal die groot hoeveelheid uriensuur die totale puriene so oorskadu, dat die konsentrasie van die totale puriene nie akkuraat genoeg bepaal sou kon word nie. Voordat die totale puriene in urine dus bepaal kan word, moet die uriensuur eers daaruit verwyder word. Die metode wat gebruik word om uriensuur uit die urine te verwyder, is uitgevoer soos beskryf deur Jørgensen (1965: 495-499). Nadat die uriensuur uit die reaksiemengsel verwyder is, kan die konsentrasie van die totale puriene in die urine bepaal word op dieselfde manier as wat die konsentrasie van die totale puriene in standaard bepaal is (Afdeling 3.2.2 en 3.3.3).

Volgens Jørgensen (1965: 495-499) hang die mate waarin die urine verdun moet word af van hoeveel urine uitgeskei is of diurese. Dit is egter nie altyd bekend nie. Daar moet dus eerder 'n manier gevind word waarvolgens die urine verdun kan word, wat onafhanklik is van diurese en wat uniform en aanpasbaar is. As voorbeeld kan die verdunning van die urine eerder uitgedruk word in verhouding tot die kreatinienwaarde van die urienmonster.

4.2.2 AANPASSING VAN DIE METODE VIR DIE GEBRUIK VAN URINE AS SUBSTRAATBRON

Die samestelling van die reaksie vir die bepaling van die totale puriene en uriensuur in urine kan in twee dele of twee stappe verdeel word.

Die eerste stap, waartydens die urikase vernietig word, of waar die urine in dieselfde mate verdun word vir die bepaling van die uriensuur, word in Tabel 4.1 uiteengesit. Hiervolgens is die verdunningsfaktor vir die bepaling van die konsentrasie van die totale puriene en uriensuur in die totale reaksievolume twintig. Vir die bepaling van die totale puriene, is die urine eers in dubbel gedistilleerde water verdun, waarna die pH tot 9.3 aangepas is deur die byvoeging van glisienbuffer. Hierna is die urikase bygevoeg en is die urienmengsel vir ongeveer 'n uur by 37°C geïnkubeer. Hierna is die urikase-aktiwiteit vernietig deur die byvoeging van gekonsentreerde NaOH wat vir vyftien minute by kamertemperatuur geïnkubeer is. Die NaOH is nodig om urikase te denatureer. Die reaksiemengsel is hierna geneutraliseer deur die byvoeging van gekonsentreerde HCl. pH-papiertjies is gebruik om neutralisering waar te neem, asook ander pH-veranderings. Hierna is die pH van die urienmengsel verstel na 7.4 deur die byvoeging van Tris.HCl buffer. Vir die bepaling van die uriensuur in die urine is die urine ook twintig keer verdun deur van dubbelgedistilleerde water gebruik te maak.

Die tweede stap, naamlik die verdere verdunnings en die uiteindelijke bepaling van die konsentrasie van die totale puriene en uriensuur, word in Tabel 4.2 uiteengesit. Die mate waarin die urienmengsel verdun is, het afgehang van die konsentrasie (C) van die puriene en uriensuur in die urine, aangesien die konsentrasie (c) van die puriene of uriensuur in die kuvet binne in 'n sekere substraatkonsentrasiegebied moet val soos in Afdeling 3.3.3 bespreek. Die bepaling van totale puriene en uriensuur is verder uitgevoer soos in Afdeling 3.3.4 beskryf en die

Tabel 4.1: Die voorbereiding van urine vir die bepaling van totale puriene (A) en uriensuur (B).

A Bepaling van Totale Puriene

Reagens	Volume (in ul)
Urine	50
Water	520
Glisienbuffer (glisien 0,6 mol/l) (pas pH aan tot 9.3)	125
Urikase (6 U/ml by 25 ⁰ C; 14,67 by 37 ⁰ C)	2,5
Meng en inkubeer by 37 ⁰ C vir ongeveer 1 uur	
<u>Vernietig Urikase :</u> 1,6 N NaOH (pas pH aan tot 11)	80
Laat staan vir 15 minute	
<u>Neutraliseer :</u> 1,6 N HCl	80 - 110
Tris.HCl-buffer (Tris 0,1 mol/l, fosfaat 3 mmol/l en EDTA 3 mmol/l) (pas pH aan tot 7.4)	142,5 - 112,5
Totaal : 1 ml	

B Bepaling van uriensuur

Reagens	Volume (in ul)
Urine	50
Water	950
Totaal : 1 ml	

Tabel 4.2: Die bepaling van die totale puriene en uriensuur in urine.

Verdunnings- faktor (f)	Volumes (in ul)				
	Van 20 keer verdunning	*Ensiem- water	Glisien- mengsel	buffer	Urikase
25	800	0	10	188	2
32	625	175	10	188	2
40	500	300	10	188	2
50	400	400	10	188	2
80	250	550	10	188	2
100	200	600	10	188	2
125	160	640	10	188	2
200	100	700	10	188	2
320	62,5	737,5	10	188	2
400	50	750	10	188	2

* Vir die bepaling van slegs uriensuur is die ensiommengsel met 10 μ l water vervang.

Die verdunnings wat uitgevoer is asook die samestelling van die reaksiemengsel word aangetoon (sien Afdeling 3.3.4). Let daarop dat die verdunningsfaktor (f) die twintig keer verdunning wat in Tabel 4.1 beskryf is, in berekening bring.

Die verandering in absorbandsie en die konsentrasie van die purien(e) is as volg bereken:

$$C = c \times f = \frac{\delta A \times 10^3}{\epsilon \times d} \times f$$

$$= \frac{\delta A \times 10^3}{1.25 \text{ l.mmol}^{-1}.\text{mm}^{-1} \times 10 \text{ mm}} = \delta A \times 80 \text{ } \mu\text{mol/l} \times f$$

Waar C: eindkonsentrasie en c: konsentrasie in die kuvet (beide $\mu\text{mol/l}$)

δA : verandering in absorbandsie by 293nm = $A_1 - A_2$

ϵ : ekstinksiekoëffisiënt van uriensuur

d: sellengte en f: verdunningsfaktor

konsentrasie bereken soos uiteengesit onderaan Tabel 4.2.

Daar is by die konsentrasiebepalings telkens van drie verdunnings gebruik gemaak wat elk in triplikaat uitgevoer is, waarna die gemiddelde waarde asook die standaardafwyking van die gemiddeld bereken is. Hierdie werkwyse is toegepas vir die bepaling van totale puriene en uriensuur in die urine van normale persone (kontrole) asook by persone met relevante metaboliese defekte soos vervolgens beskryf word.

4.2.3. DIE ENSIMATIESE BEPALING VAN DIE TOTALE PURIENE IN DIE URINE VAN KONTROLEPERSONE EN PERSONE MET RELEVANTE METABOLIESE DEFESTE

Die konsentrasies van die totale puriene is bepaal in die urine van vyftien kontrolepersone (normalepersone), een persoon met adensiendeaminase-defek (ADA-defek), vyf persone met adenilosuksinase-defek, drie persone met Lesch-Nyhansindroom, vyf persone met molibdeenkofaktortekort, drie persone met puriennukleosiedfosforilasedefek (PNP-defek), vyf persone met OCT-defek en vier persone met xantienurie (hierdie defekte is in Afdeling 2.2 bespreek). Die totale puriene in urine is bepaal soos beskryf is in Afdeling 4.2 en die resultate is in Tabel 4.3 uiteengesit en grafies voorgestel in Figure 4.1 (kontrole), 4.2 (ADA- en adenilosuksinase-defek), 4.3 (Lesch-Nyhansindroom), 4.4. (molibdeenkofaktortekort), 4.5 (PNP-defek), 4.6 (OCT-defek) en 4.7 (xantienurie). Die urienmonsters is verkry vanaf die metaboliese eenheid van die Departement biochemie by die PU vir CHO.

Vir die kontrolepersone se urine sowel as vir elke defek, met die uitsondering van ADA-defek, waarvan daar net een urienmonster beskikbaar was, is 'n gemiddeld en standaardafwyking vasgestel. Die gemiddeld en standaardafwyking van elke urienmonster en van elke defek word in Tabel 4.3 saamgevat.

Hierdie gemiddelde en standaardafwykings is gebruik om die grense waarbinne die konsentrasies totale puriene in die urine van persone met die defekte of urine van kontrolepersone voorkom, te bepaal. Die hoogste waarde verkry, vorm die boonste grens en die laagste waarde die onderste grens. Hierdie grense word ook in Figure 4.1 tot 4.7 aangetoon.

Die konsentrasies van die totale puriene is verder vergelyk met die hoeveelheid kreatinien in die urine (om te kompenseer vir diurese) en die waarde is verwerk tot mmol/l per mg kreatinien soos in Tabel 4.3 aangedui. Die kreatinienwaarde is verkry vanaf die metaboliese eenheid van die Departement biochemie by die PU vir CHO, aangesien dit vir alle urienmonsters in hulle besit bepaal word. Dit is die gebruik in die laboratorium om alle konsentrasiewaardes uit te druk in verhouding tot kreatinienwaarde, aangesien die resultate van verskillende tegnieke, maar dieselfde urienmonster, dan makliker vergelyk kan word om sodoende 'n meer akkurate konsentrasiebepaling van 'n metaboliet te verkry. Die kreatinienwaarde is verkry met behulp van 'n Technicon RA-100TM-sisteem en word uitgedruk as mg % kreatinien, met ander woorde mg kreatinien per 100 ml urine.

In Bylae B word die data wat verkry is tydens die bepaling van die konsentrasies van die totale puriene en uriensuur van een urienmonster uiteengesit.

Uit die resultate (Tabel 4.3 en Figure 4.1 tot 4.7) kan waargeneem word dat die grense van die molibdeenkofaktortekort en PNP-defek duidelik bo die grense van die kontrolelesings is, en kan die purieninhoud in die urine van persone met hierdie defekte duidelik van die normaalwaardes onderskei word. Die grense van ADA-defek, adenosuksinase-defek, Lesch-Nyhan-sindroom, OCT-defek en xantienurie oorvleuel met die grense van die kontrolelesings en die purieninhoud in die urine van persone met hierdie defekte kan dus nie van die normaalwaardes onder

Tabel 4.3: Die bepaling van die totale puriene in urine van kontrole persone en persone met relevante metabolismiese defekte.

Groep	Konsentrasie ($\mu\text{mol/l}$)		mg % kreatinien	Konsentrasie (mmol/l per mg kreatinien)		
Kontrolegroep						
U	316	± 8	78,50	0,403	±	0,010
A	37	± 5	28,17	0,131	±	0,018
B	186	± 12	58,71	0,317	±	0,020
C	153	± 50	22,62	0,676	±	0,221
D	129	± 10	88,35	0,146	±	0,011
E *	≤ 23	± 4	3,12	0,737	±	0,128
F	283	± 5	145,25	0,195	±	0,003
G	208	± 14	21,72	0,958	±	0,064
H	35	± 8	29,30	0,119	±	0,027
I	151	± 10	72,74	0,208	±	0,014
L	28	± 10	1,58	1,772	±	0,633
M	94	± 12	75,79	0,124	±	0,016
N	123	± 5	106,98	0,115	±	0,005
O	48	± 28	19,11	0,251	±	0,147
P *	≤ 23	± 4	19,68	<u>0,117</u>	±	<u>0,020</u>
Gemiddeld:				0,418	±	0,458
Adenosiendeaminase-defek (ADA-defek)						
1a	333	± 23	28,00	1,189	±	0,082
Adenilosuksinase-defek						
2b	5984	± 388	201,56	2,969	±	0,192
2c	853	± 46	44,08	1,935	±	0,104
2d	85	± 9	53,30	0,159	±	0,017
2e	307	± 23	21,75	1,411	±	0,106
2f	232	± 29	44,84	<u>0,517</u>	±	<u>0,065</u>
Gemiddeld:				1,398	±	1,126

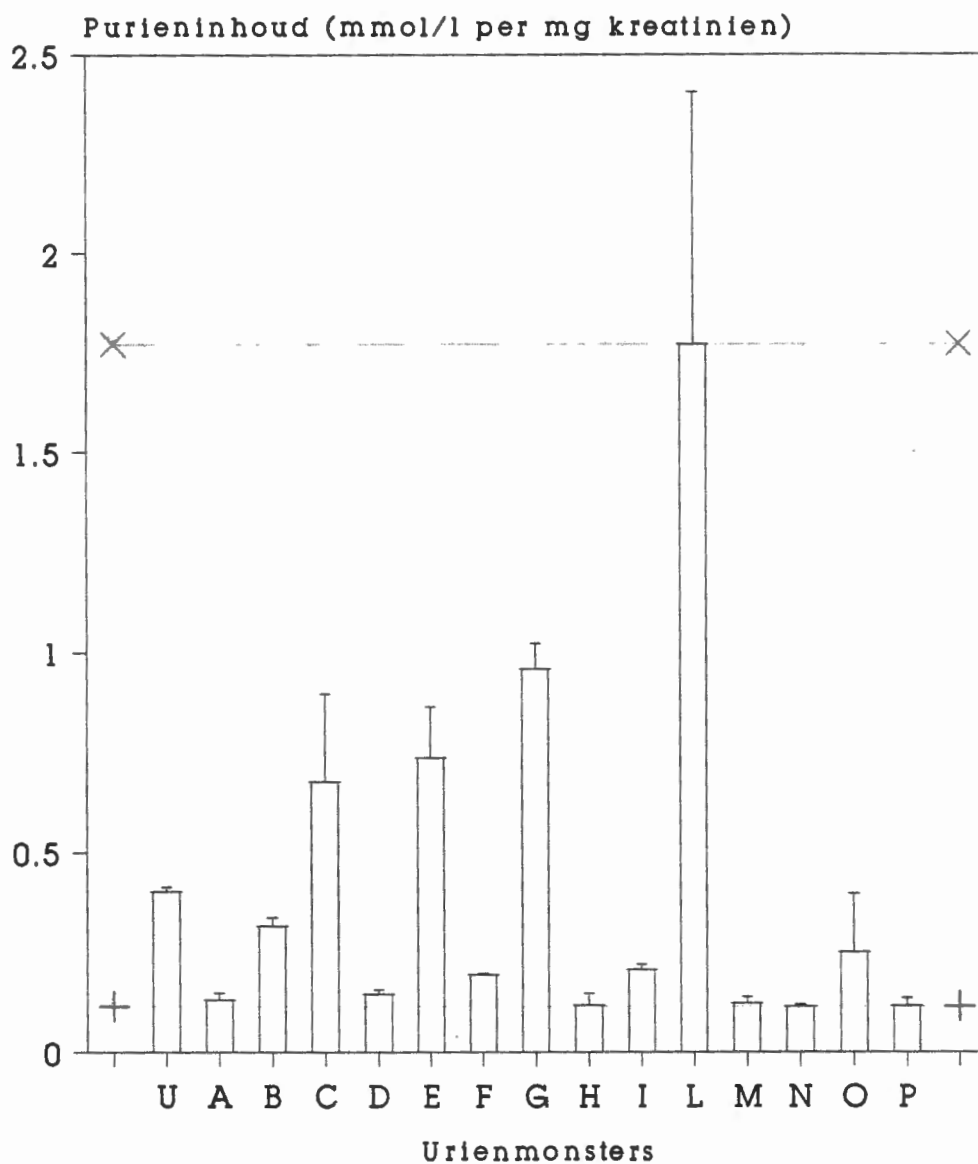
Tabel 4.3 : (vervolg)

Groep	Konsentrasie (μ mol/l)	mg % kreatinien	Konsentrasie (mmol/l per mg kreatinien)		
Lesch-Nyhansindroom					
3a	171 $\pm$ 18	18,35	0,932	$\pm$	0,098
3b	288 $\pm$ 32	32,17	0,895	$\pm$	0,099
3c	309 $\pm$ 18	37,93	<u>0,815</u>	$\pm$	<u>0,047</u>
Gemiddeld:			0,881	$\pm$	0,060
Molibdeenkofaktor-tekort					
4b	307 $\pm$ 23	3,79	8,100	$\pm$	0,607
4c	419 $\pm$ 20	11,38	3,682	$\pm$	0,176
4d	368 $\pm$ 42	6,92	5,318	$\pm$	0,607
4e	160 $\pm$ 0	4,62	3,463	$\pm$	0,000
4f	272 $\pm$ 42	7,11	<u>3,826</u>	$\pm$	<u>0,591</u>
Gemiddeld:			4,878	$\pm$	1,944
Puriennukleosiedfosforilase-defek (PNP-defek)					
5a	6227 $\pm$ 707	51,67	12,051	$\pm$	1,368
5b	5056 $\pm$ 417	33,23	15,215	$\pm$	1,255
5c	5547 $\pm$ 489	46,60	<u>11,903</u>	$\pm$	<u>1,049</u>
Gemiddeld:			13,056	$\pm$	1,871
OCT-defek					
6a	147 $\pm$ 23	35,93	0,409	$\pm$	0,064
6b	76 $\pm$ 23	13,89	0,547	$\pm$	0,166
6c	42 $\pm$ 33	8,21	0,512	$\pm$	0,402
6d	87 $\pm$ 13	3,46	2,514	$\pm$	0,376
6e	86 $\pm$ 12	7,03	<u>1,223</u>	$\pm$	<u>0,171</u>
Gemiddeld:			1,041	$\pm$	0,884

Tabel 4.3 : (vervolg)

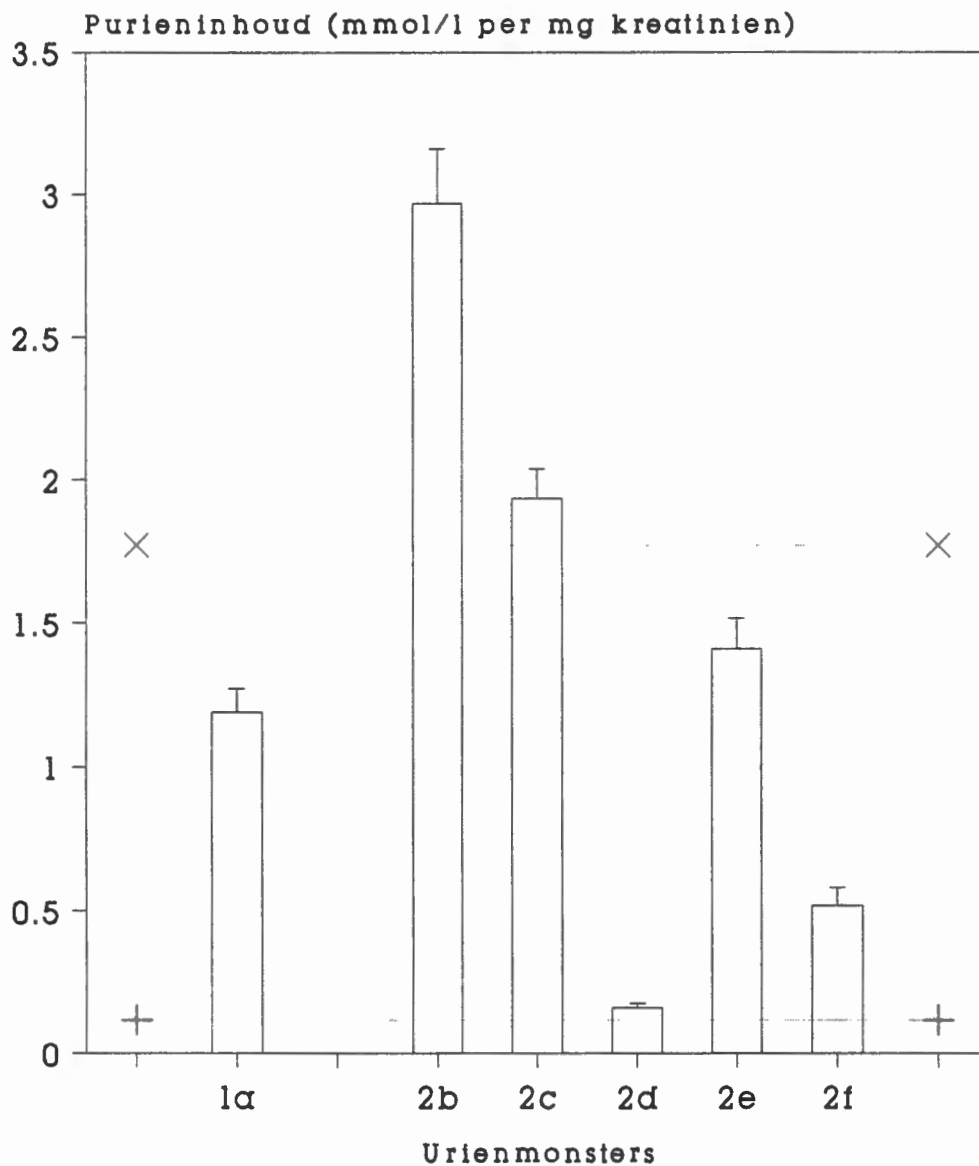
Groep	Konsentrasie ($\mu\text{mol/l}$)	mg % kreatinien	Konsentrasie (mmol/l per mg kreatinien)
Xantienurie			
7a	589 $\pm$ 26	58,68	1,004 $\pm$ 0,044
7b	640 $\pm$ 0	66,91	0,957 $\pm$ 0,000
7c	909 $\pm$ 26	71,93	1,264 $\pm$ 0,036
7d	872 $\pm$ 29	58,33	<u>1,495 $\pm$ 0,050</u>
Gemiddeld:			1,180 $\pm$ 0,250

* Tydens die bepaling van die konsentrasie van die totale puriene by sommige kontrolepersone se urienmonsters, is 'n absorbansieverandering van nul verkry vir sommige van die drie herhalings. Aangesien die kreatinienwaardes van die meeste van hierdie urienmonsters baie laag is, kan die rede moontlik wees dat die urine so verdun is dat die klein konsentrasie totale puriene nie waargeneem kon word nie. Die nullesing word daarom geïgnoreer en slegs die lesings wat groter as nul is, word aangedui. Aangesien die moontlikheid bestaan dat die lesings wel nul of kleiner as die aangetoonde waarde mag wees, word aangedui dat die werklike waarde kleiner of gelyk aan ($\leq$) hierdie berekende waarde is.



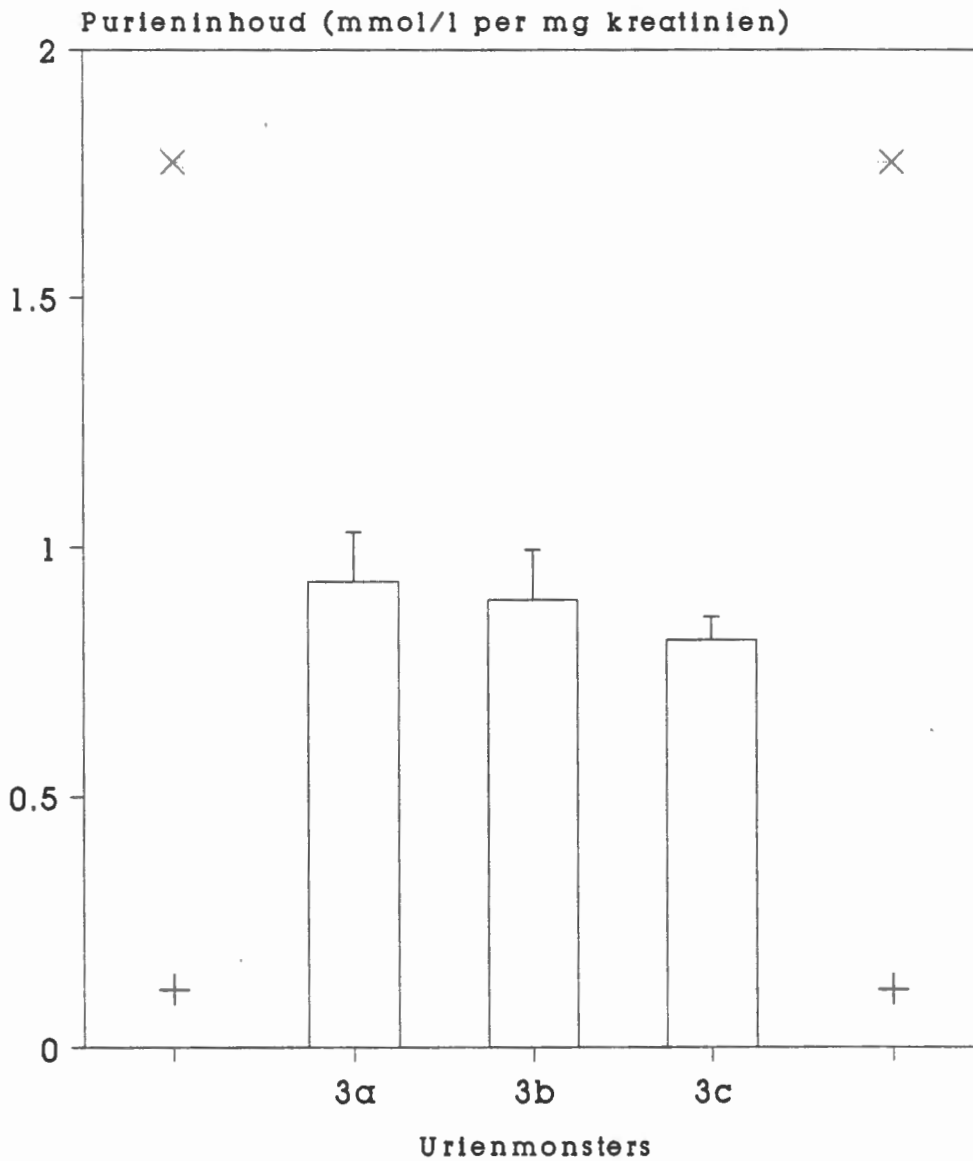
Figuur 4.1: Die konsentrasie totale puriene in die urine by vyftien kontrolepersone.

X X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



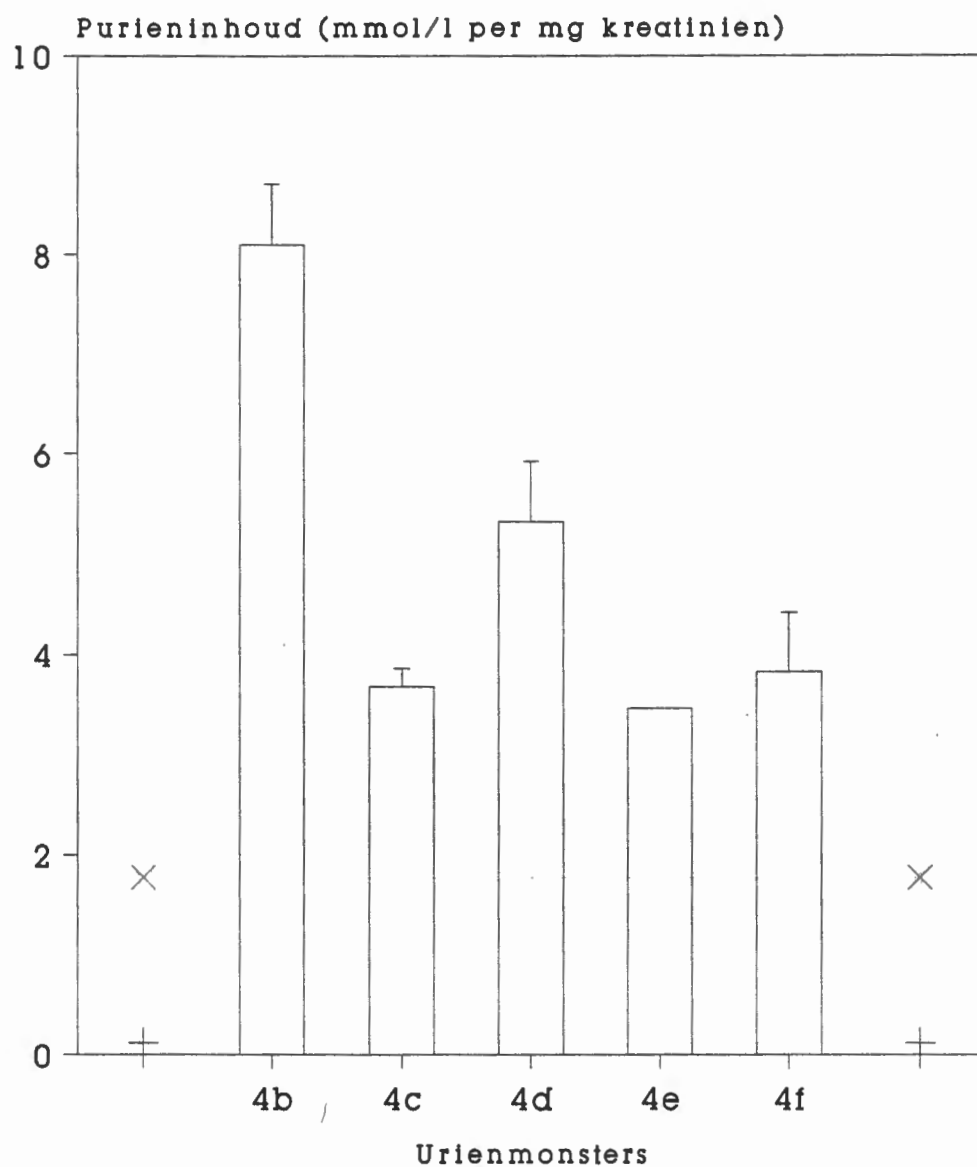
Figuur 4.2: Die konsentrasie totale puriene in die urine by een persoon met ADA-defek en vyf persone met adenilosuksinase-defek.

X -- X Boonste normaalgrens
 + --- + Onderste normaalgrens



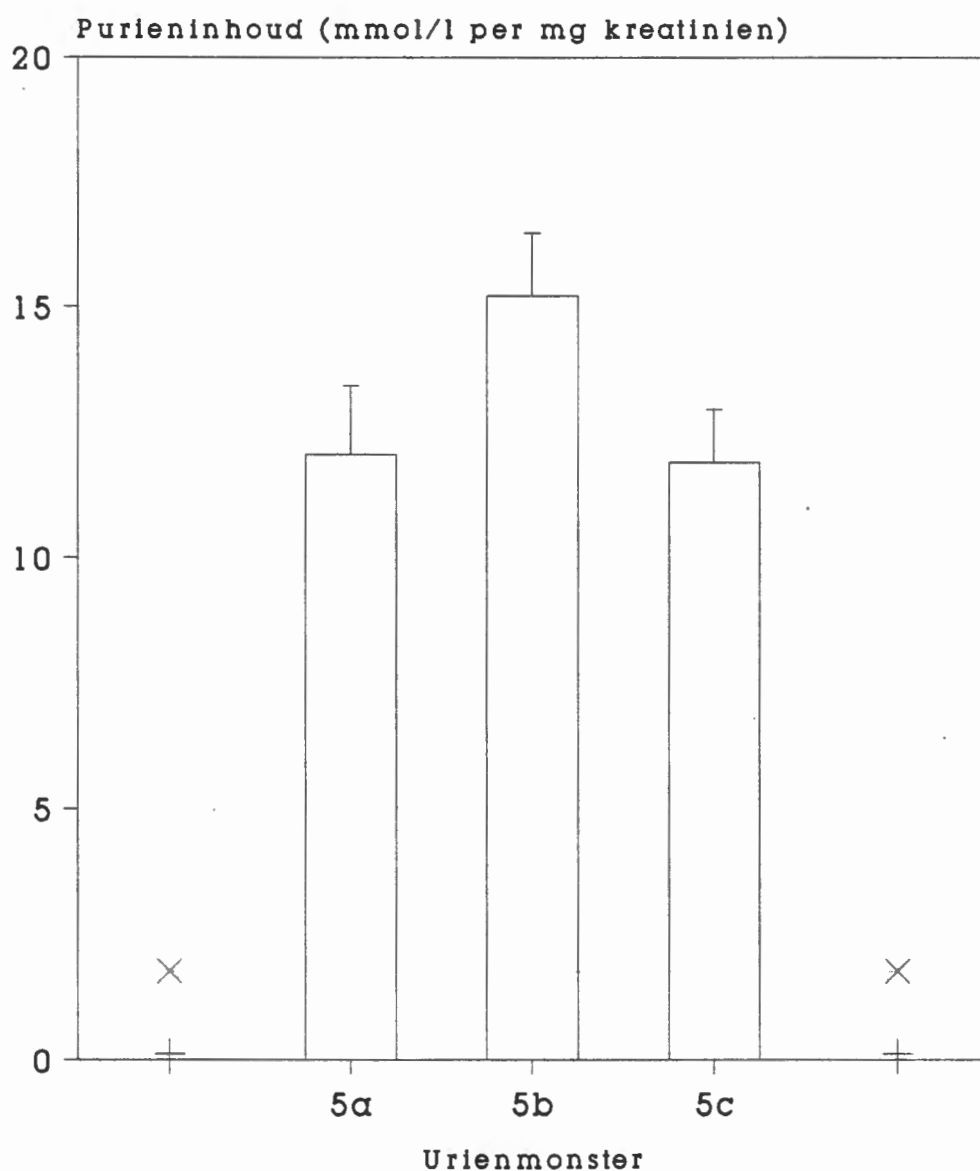
Figuur 4.3: Die konsentrasie totale puriene in die urine by drie persone met Lesch-Nyhansindroom.

X X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



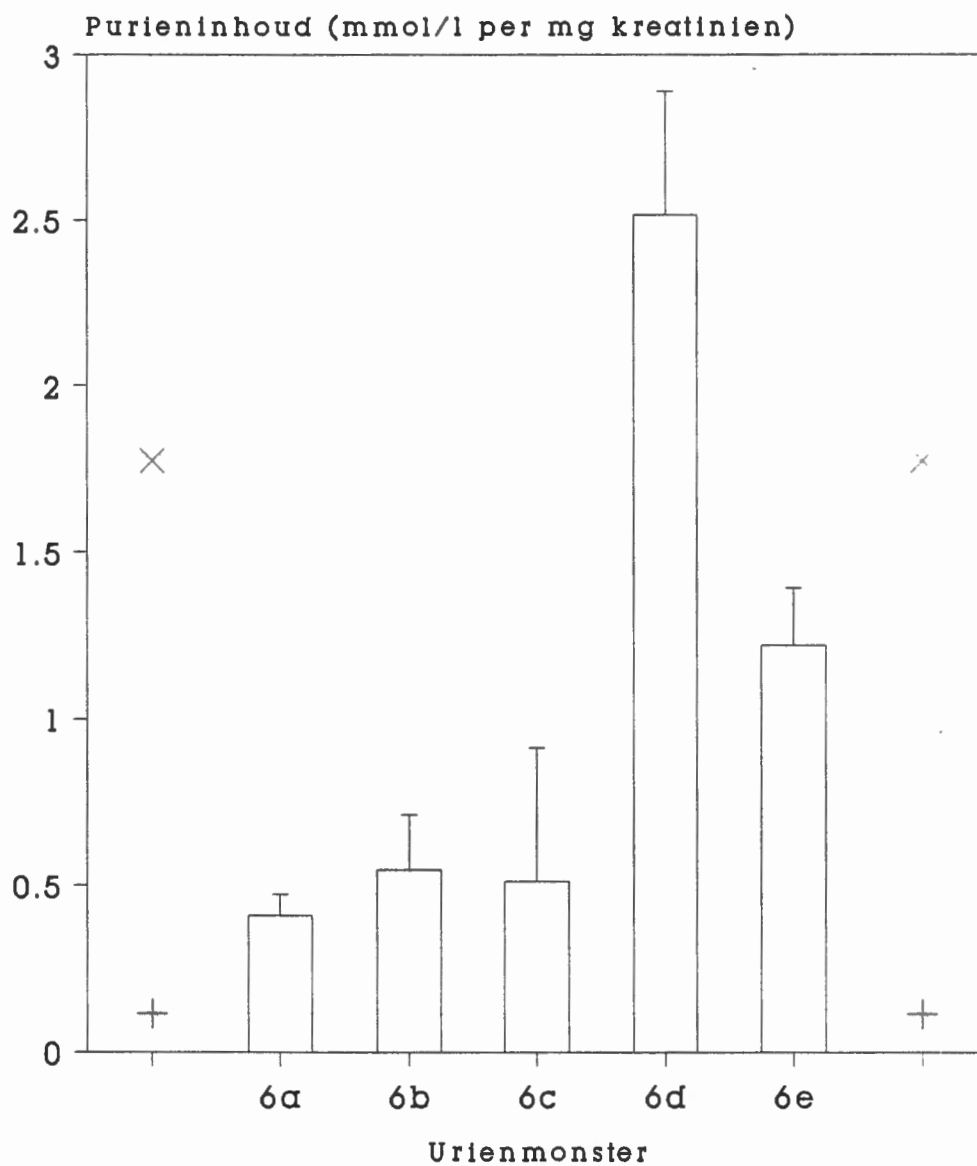
Figuur 4.4: Die konsentrasie totale puriene in die urine by vyf persone met molibdeenkofaktor-tekort.

X X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



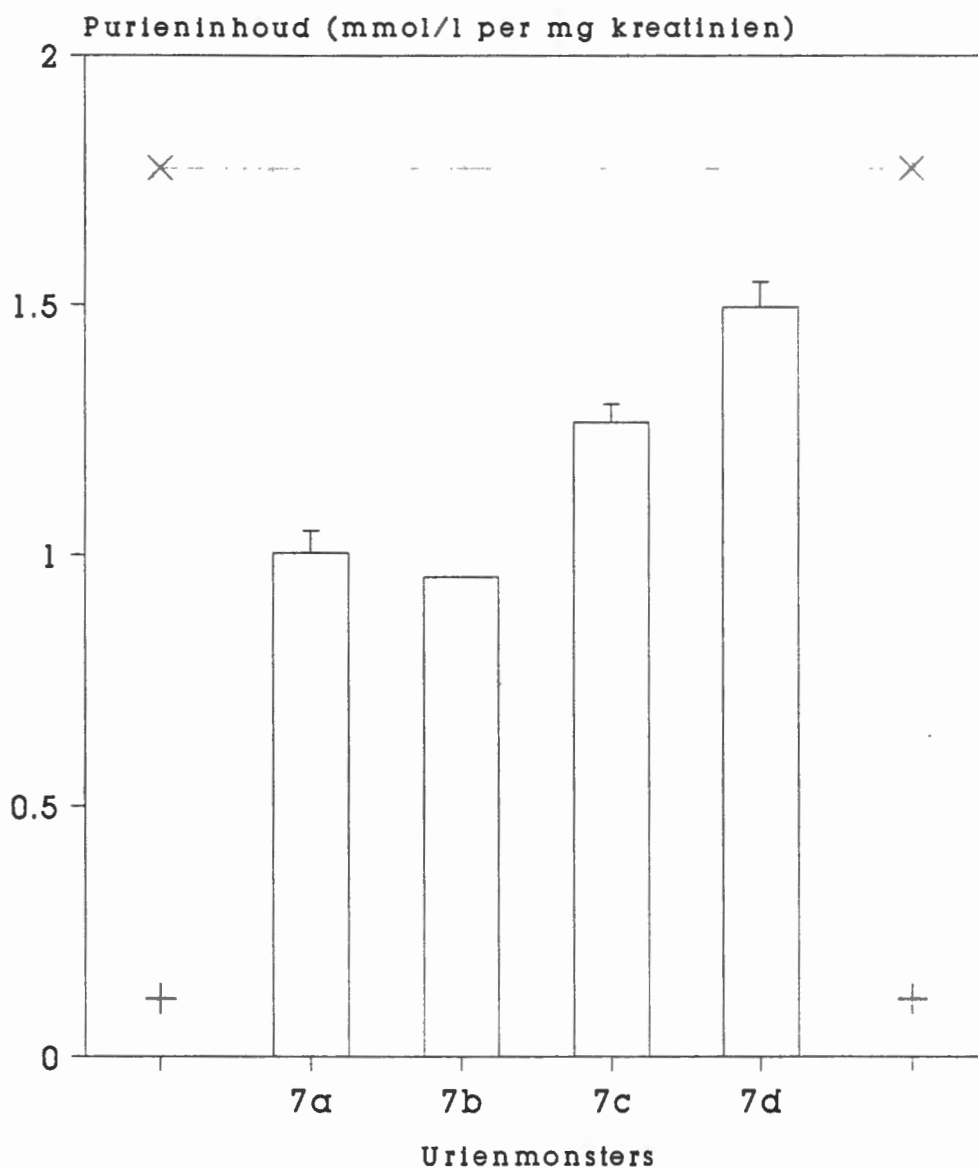
Figuur 4.5: Die konsentrasie totale puriene in die urine by drie persone met PNP-defek.

X -- -X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



Figuur 4.6: Die konsentrasie totale puriene in die urine by vyf persone met OCT-defek.

X X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



Figuur 4.7: Die konsentrasie totale puriene in die urine by vier persone met xantienurie.

X	X Boonste normaalgrens
+	+ Onderste normaalgrens

skei word nie.

4.2.4. DIE BEPALING VAN DIE KONSENTRASIE URIENSUUR IN URINE VAN KONTROLEPERSONE EN PERSONE MET METABOLIESE DEFEKTE

Die konsentrasie van die uriensuur in die urine van dieselfde groep proefpersone soos beskryf in Afdeling 4.2.3 is bepaal soos in Afdeling 4.2.2 beskryf is.

Die resultate is uiteengesit in Tabel 4.4 en grafies voorgestel in Figure 4.8 (kontrole), 4.9 (ADA- en adenilosuksinase-defek), 4.10 (Lesch-Nyhansindroom), 4.11 (molibdeenkofaktor-tekort), 4.12 (PNP-defek), 4.13 (OCT-defek) en 4.14 (xantienurie). Die resultate en die grense van die defekte word net soos by die bepaling van totale puriene in urine (Afdeling 4.2.3) voorgestel. Sommige defekte se waardes was heelwat laer as die kontrolewaardes, en die grense van die kontrolewaardes word in hierdie geval nie aangedui nie.

In Tabel 4.4 en Figure 4.8 tot 4.14, kan waargeneem word dat die grense van molibdeenkofaktor-tekort en xantienurie duidelik onder die grense van die normaalwaardes is. Hierdie defekte kan dus op grond van die konsentrasie van uriensuur van die kontrole-urine onderskei word. Die grense waarbinne die waardes van ADA-defek, adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhansindroom en OCT-defek lê, oorvleuel met die grense waarbinne die kontrolewaardes lê, en die defekte kan dus nie van die kontrole-urine onderskei word nie. Van die PNP-defekgroep lê twee van die urienmonsters se waardes wel duidelik onder die normaalgrense, maar die derde waarde lê duidelik binne die normaalgrense en kan die defek nie van die kontrole-urine onderskei word nie.

Tabel 4.4: Die bepaling van die uriensuur in urine van kontrolepersone en persone met relevante metaboliese defekte.

Groep	Konsentrasie ($\mu\text{mol/l}$)	mg % kreatinien	Konsentrasie (mmol/l per mg kreatinien)		
Kontrolegroep					
U	6646 $\pm$ 443	78,50	8,466	$\pm$	0,564
A	1248 $\pm$ 115	28,17	4,430	$\pm$	0,408
B	4885 $\pm$ 906	58,71	8,321	$\pm$	1,543
C	1472 $\pm$ 55	22,62	6,508	$\pm$	0,243
D	2859 $\pm$ 37	88,35	3,236	$\pm$	0,042
E	400 $\pm$ 80	3,12	12,812	$\pm$	2,562
F	7253 $\pm$ 489	145,25	4,993	$\pm$	0,337
G	1664 $\pm$ 111	21,72	7,661	$\pm$	0,511
H	1797 $\pm$ 40	29,30	6,133	$\pm$	0,137
I	3211 $\pm$ 268	72,74	4,414	$\pm$	0,368
L	173 $\pm$ 23	1,58	10,949	$\pm$	1,456
M	860 $\pm$ 53	75,79	1,135	$\pm$	0,070
N	2573 $\pm$ 23	106,98	2,405	$\pm$	0,021
O	913 $\pm$ 42	19,11	4,778	$\pm$	0,220
P	773 $\pm$ 46	19,68	<u>3,928</u>	$\pm$	<u>0,234</u>
Gemiddeld:			6,011	$\pm$	3,178
Adenosiendeaminase-defek (ADA-defek)					
1a	3104 $\pm$ 85	28,00	11,086	$\pm$	0,304
Adenilosuksinase-defek					
2b	3648 $\pm$ 169	201,56	1,815	$\pm$	0,084
2c	3684 $\pm$ 169	44,08	8,358	$\pm$	0,383
2d	1280 $\pm$ 0	53,30	2,402	$\pm$	0,000
2e	1493 $\pm$ 185	21,75	6,864	$\pm$	0,851
2f	2752 $\pm$ 169	44,84	<u>6,137</u>	$\pm$	<u>0,377</u>
Gemiddeld:			5,115	$\pm$	2,867

Tabel 4.4: (vervolg)

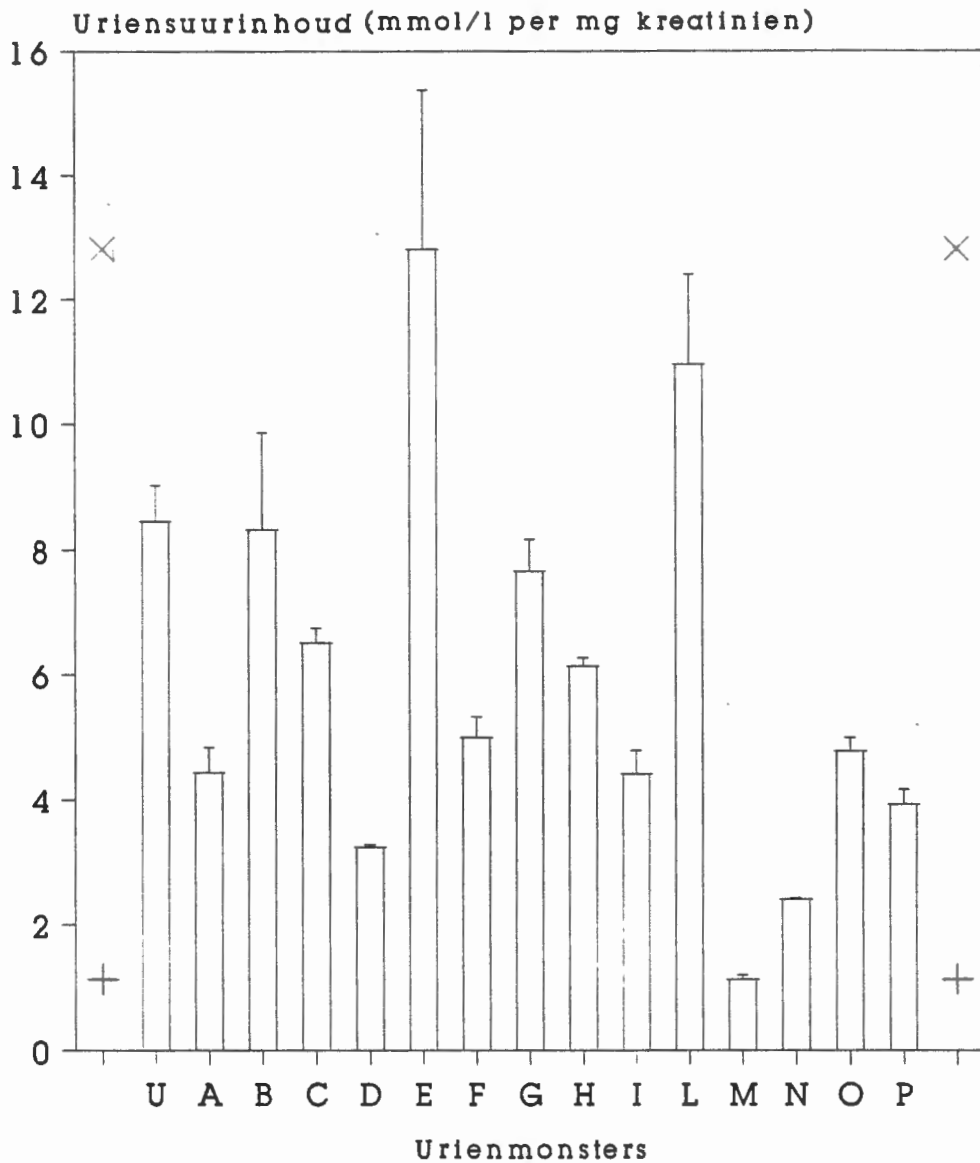
Groep	Konsentrasie ($\mu\text{mol/l}$)	mg % kreatinien	Konsentrasie (mmol/l per mg kreatinien)		
Lesch-Nyhansindroom					
3a	3733 $\pm$ 185	18,35	20,343	$\pm$	1,008
3b	1856 $\pm$ 166	32,17	5,769	$\pm$	0,516
3c	887 $\pm$ 81	37,93	<u>2,339</u>	$\pm$	<u>0,214</u>
Gemiddeld:			9,484	$\pm$	9,560
Molibdeenkofaktor-tekort					
4b *	< 20 $\pm$ 0	3,79	0,528	$\pm$	0,000
4c	61 $\pm$ 20	11,38	0,536	$\pm$	0,176
4d *	< 20 $\pm$ 0	6,92	0,289	$\pm$	0,000
4e **	$\leq$ 40 $\pm$ 0	4,62	0,866	$\pm$	0,000
4f *	< 20 $\pm$ 0	7,11	<u>0,281</u>	$\pm$	<u>0,000</u>
Gemiddeld:			0,500	$\pm$	0,239
Puriennukleosiedfosforilase-defek (PNP-defek)					
5a	680 $\pm$ 69	51,67	1,316	$\pm$	0,134
5b	120 $\pm$ 40	33,23	0,361	$\pm$	0,120
5c *	< 20 $\pm$ 0	46,60	<u>0,043</u>	$\pm$	<u>0,000</u>
Gemiddeld:			0,573	$\pm$	0,662
OCT-defek					
6a	2560 $\pm$ 0	35,93	7,125	$\pm$	0,000
6b	453 $\pm$ 46	13,89	3,261	$\pm$	0,331
6c	393 $\pm$ 90	8,21	4,787	$\pm$	1,096
6d	573 $\pm$ 83	3,46	16,561	$\pm$	2,399
6e	627 $\pm$ 23	7,03	<u>8,919</u>	$\pm$	<u>0,327</u>
Gemiddeld:			8,131	$\pm$	5,186

Tabel 4.4: (vervolg)

Groep	Konsentrasie ($\mu\text{mol/l}$)	mg % kreatinien	Konsentrasie (mmol/l per mg kreatinien)
Xantienurie			
7a ** $\leq$	36 $\pm$ 6	58,68	0,061 $\pm$ 0,010
7b * $<$	20 $\pm$ 0	66,91	0,030 $\pm$ 0,000
7c ** $\leq$	30 $\pm$ 14	71,93	0,042 $\pm$ 0,019
7d ** $\leq$	36 $\pm$ 6	58,33	<u>0,062 $\pm$ 0,010</u>
Gemiddeld:			0,049 $\pm$ 0,016

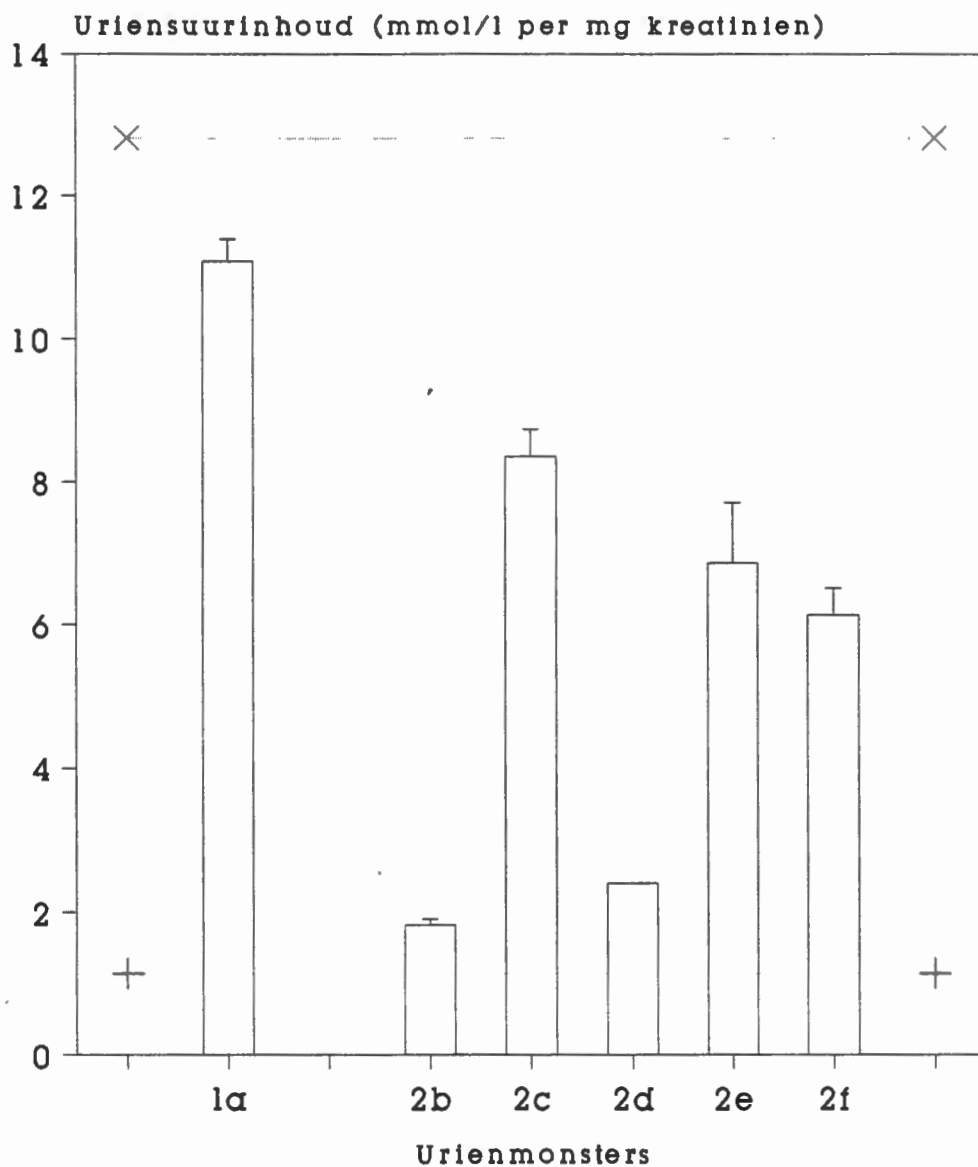
* Tydens die bepaling van die konsentrasie uriensuur in urienmonsters van sommige defekte, is 'n absorpsieverandering van nul by al drie herhalings verkry. Aangesien die moontlikheid bestaan dat die konsentrasie nie nul is nie, maar wel 'n baie lae waarde, word die konsentrasie van die urienmonsters gelykgestel aan die laagste moontlike konsentrasiewaarde wat waargeneem kan word indien daar van die kleinste verdunning (waarvan die verdunningsfaktor vyf-en-twintig is) gebruik sou word, naamlik 20 $\mu\text{mol/l}$. Aangesien dit nie die werklike waardes was nie, word aangedui dat die werklike waarde kleiner is ($<$) as die aangetoonde waarde.

**Tydens die bepaling van die konsentrasie uriensuur in urienmonsters van sommige defekte, is 'n absorpsieverandering van nul by sommige van die herhalings verkry. Aangesien dit meestal by die grootste verdunning van die drie herhalings plaasgevind het, is die lesings geïgnoreer, en is die gemiddeld en die standaardafwyking van die urienmonster bereken uit dié waardes wat groter as nul was. Die moontlikheid bestaan egter nog dat die werklike waarde wel nul mag wees, of laer mag wees as die waarde wat nou bereken is en daarom word aangedui dat die waarde kleiner of gelyk aan ($\leq$) die berekende waarde is.



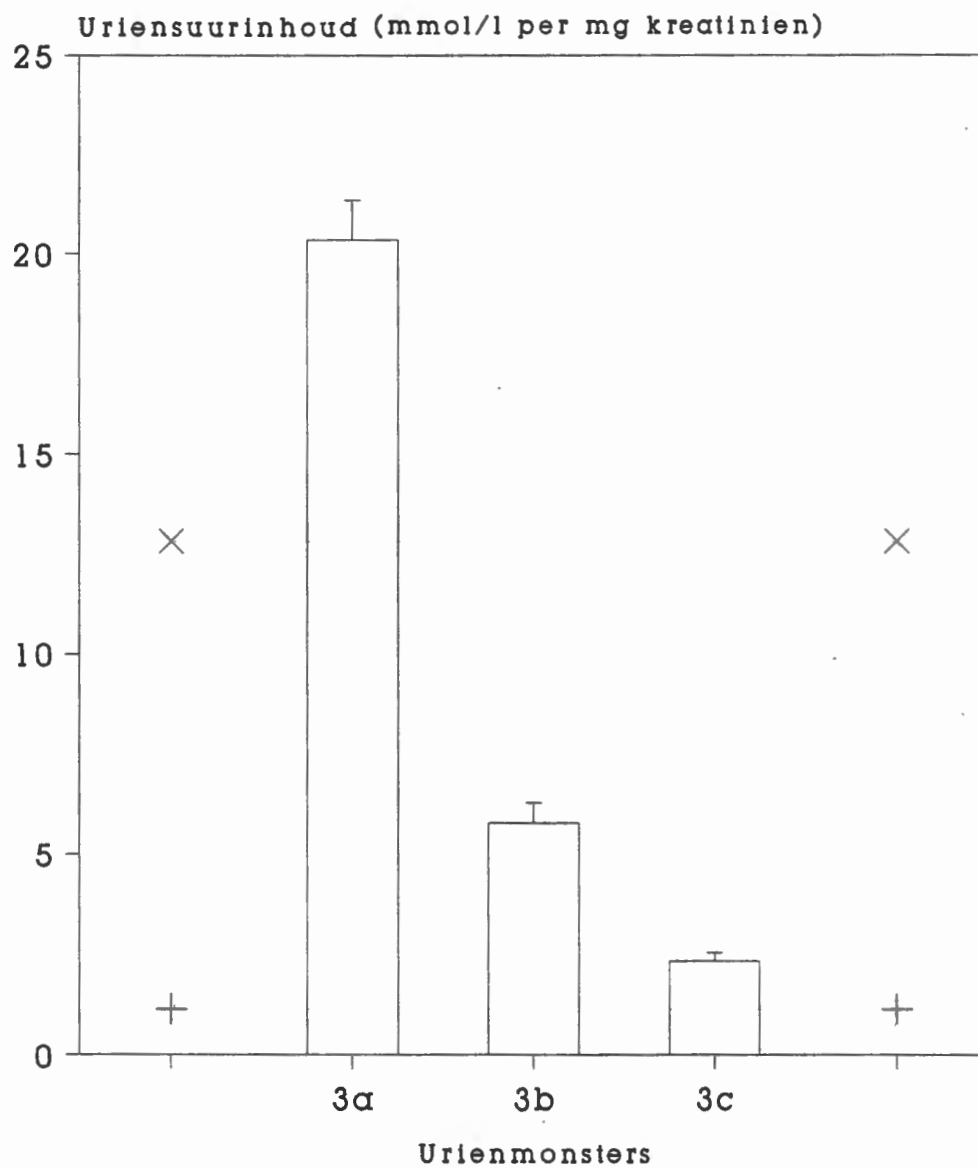
Figuur 4.8: Die konsentrasie uriensuur in die urine by vyftien kontrolepersone.

X X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



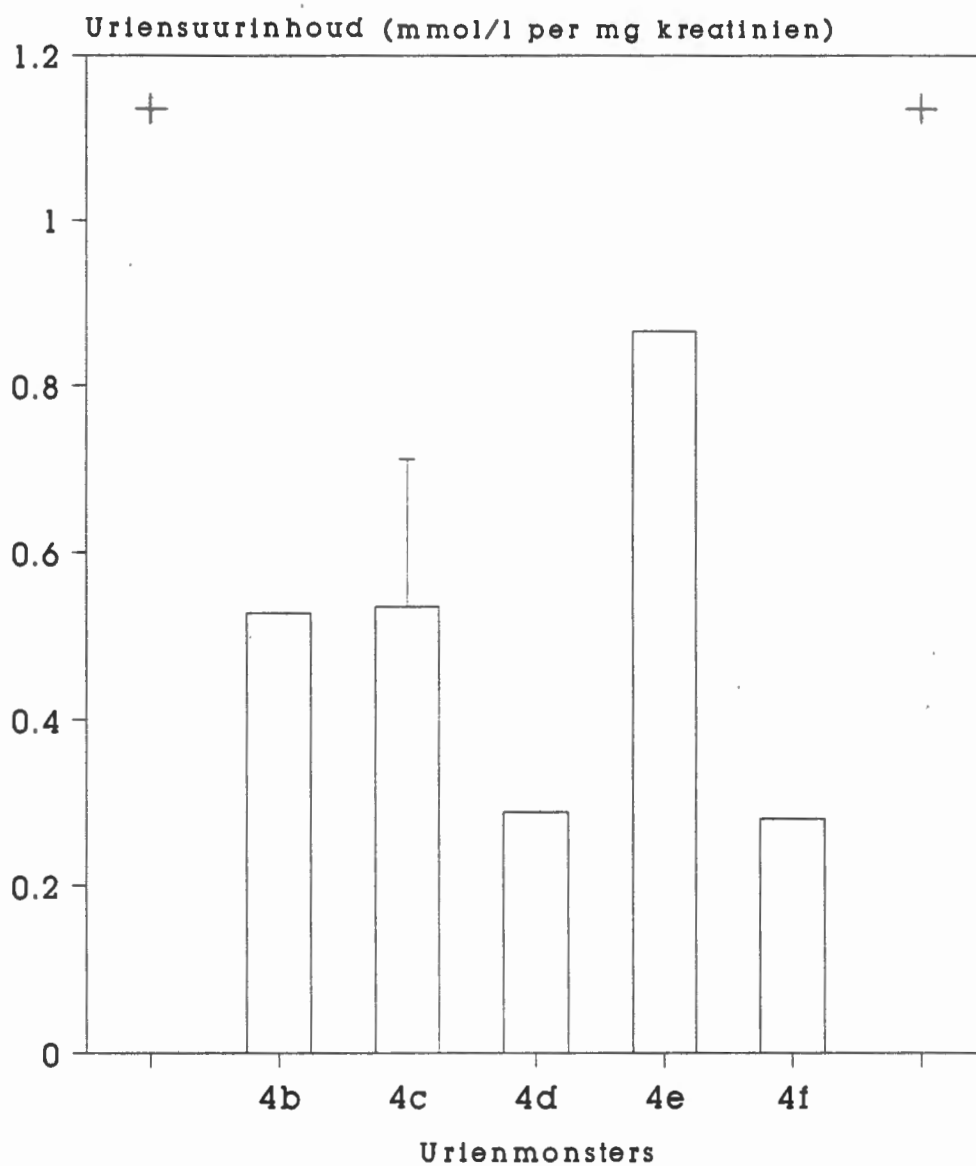
Figuur 4.9: Die konsentrasie uriensuur in die urine by een persoon met ADA-defek en vyf persone met adenilosuksinase-defek.

X --- X Boonste normaalgrens
 + --- + Onderste normaalgrens



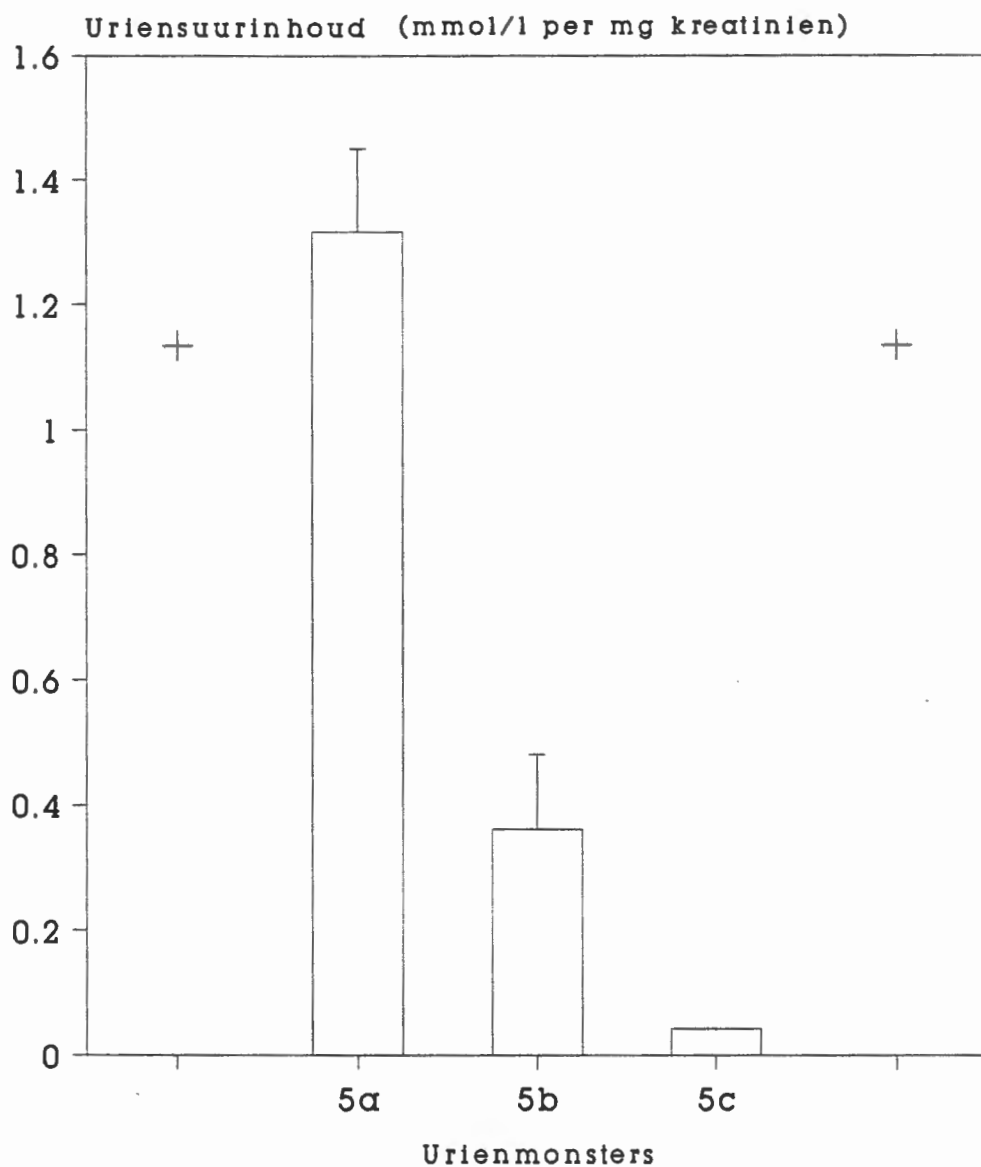
Figuur 4.10: Die konsentrasie uriensuur in die urine by drie persone met Lesch-Nyhansindroom.

X X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



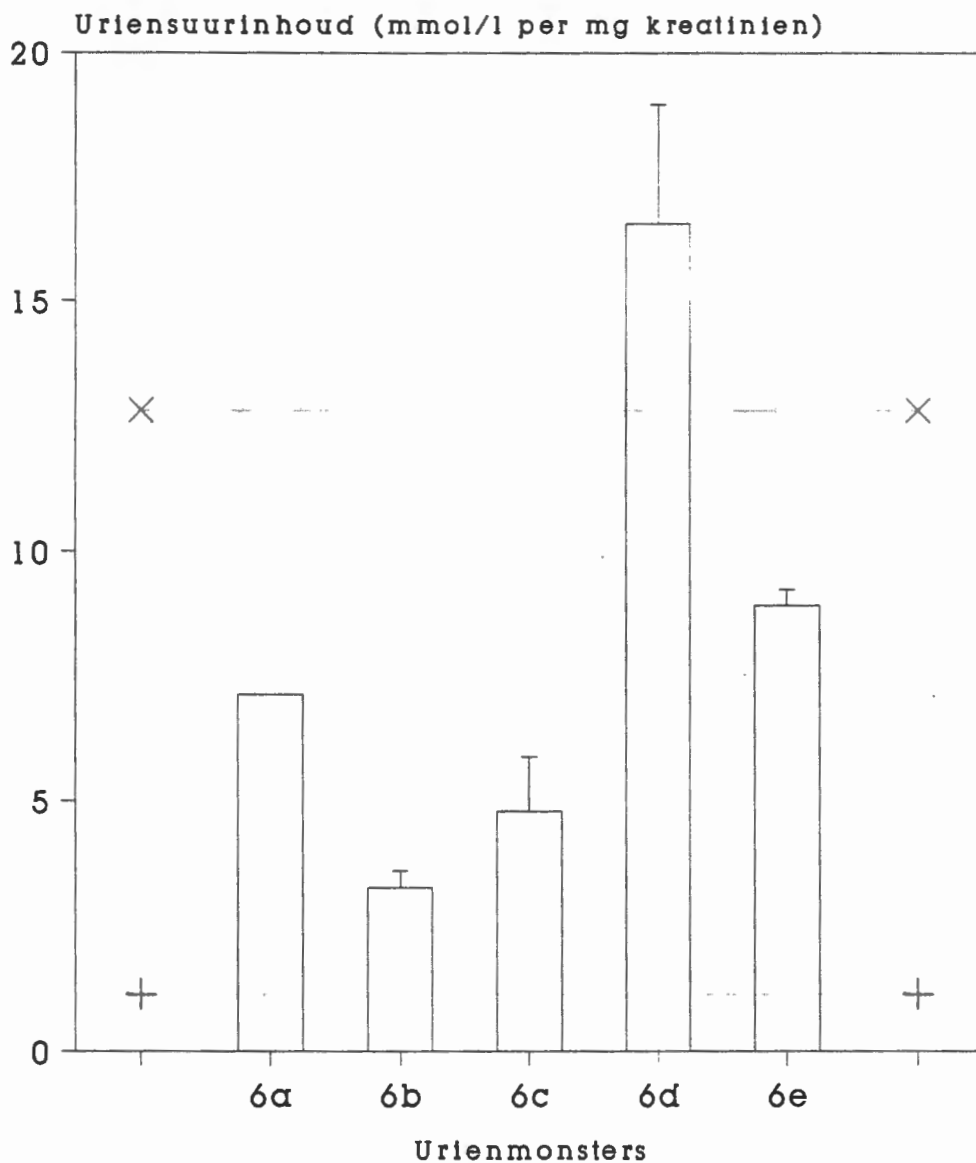
Figuur 4.11: Die konsentrasie uriensuur in die urine by vyf persone met molibdeenkofaktor-tekort.

+ + Onderste normaalgrens



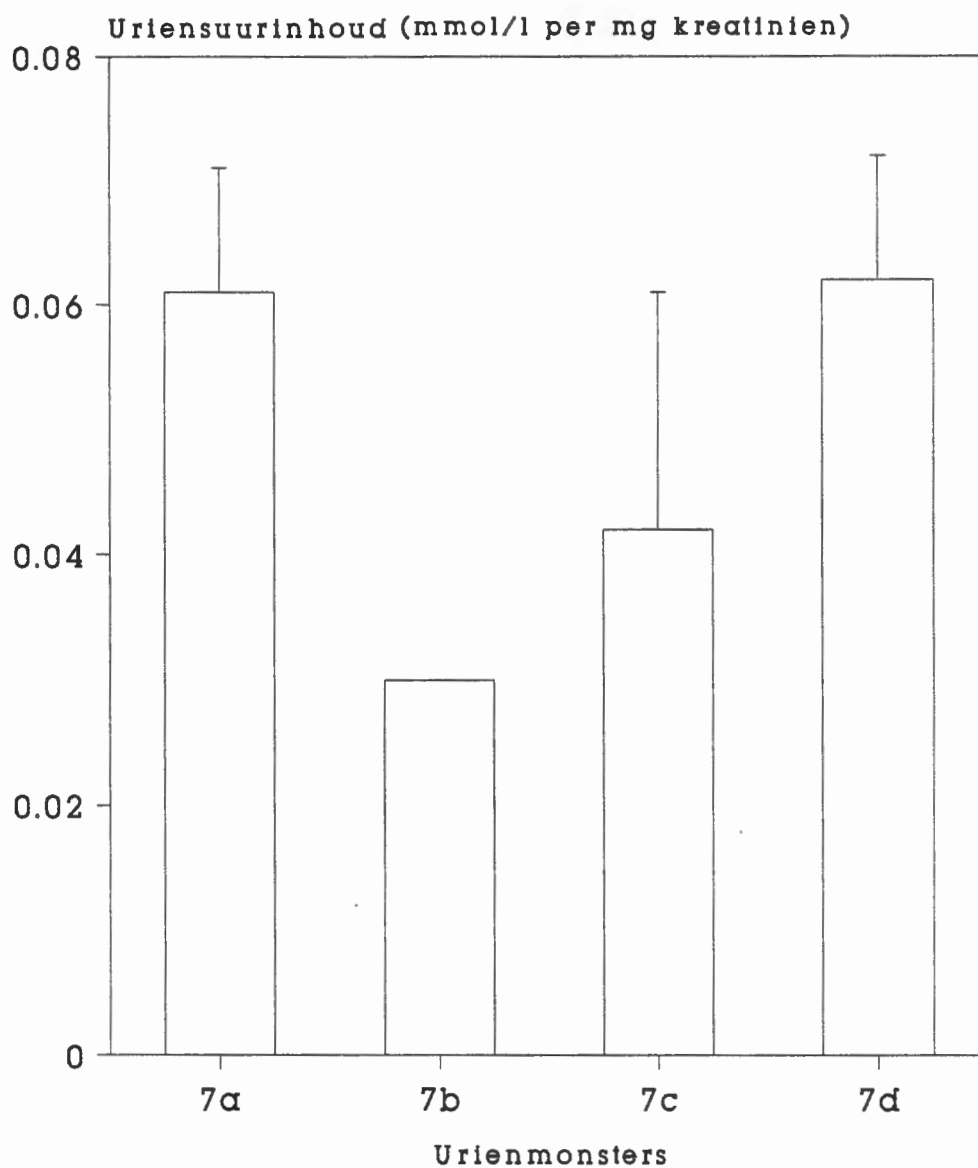
Figuur 4.12: Die konsentrasie uriensuur in die urine by drie persone met PNP-defek.

+ + Onderste normaalgrens



Figuur 4.13: Die konsentrasie uriensuur in die urine by vyf persone met OCT-defek.

X X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



Figuur 4.14: Die konsentrasie uriensuur in die urine by vier persone met xantienurie.

4.3. DIE EVALUERING VAN DIE KONSENTRASIE TOTALE PURIENE EN URIENSUUR IN 'N KONTROLE-URIENMONSTER, DEUR MIDDEL VAN 'N BELADINGSTOETS

Om te bevestig dat die metode wel sensitief is vir klein of groot veranderinge in die konsentrasie van enige purien of uriensuur in urine, is bekende hoeveelhede puriene en uriensuur by 'n kontrole-urienmonster gevoeg en die konsentrasie van die totale puriene of uriensuur bepaal (sien Afdeling 4.2). Hierdie belading van die urine met puriene en uriensuur gee 'n aanduiding of daar enige onbekende faktore in die urine teenwoordig is wat die bepaling van die konsentrasie van die totale puriene of uriensuur beïnvloed.

Die kontrole-urienmonster nommer D is gebruik, aangesien die waardes verkry vir totale puriene ($129 \pm 10 \mu\text{mol/l}$) en uriensuur ($2\ 859 \pm 37 \mu\text{mol/l}$) in dié urienmonster na aan die gemiddelde waarde van die kontrolegroep was (sien Afdelings 4.2.3 en 4.2.4 en Tabelle 4.3 en 4.4). Vir elke purien (adenosien, inosien, guanosien, guanien, hipo-xantien en xantien) en uriensuur is 'n standaardoplossing van 2 mmol/l saamgestel (sien Afdeling 3.3.1.b). Hierdie standaardoplossings is gebruik om $0,5 \text{ mmol/l}$ en $0,1 \text{ mmol/l}$ standaardoplossings saam te stel.

Tydens die beladingstoetse is die konsentrasie totale puriene en uriensuur in die standaardoplossings eerstens bepaal om vir eksperimentele veranderlikes te kompenseer. Vir hierdie bepaling is die drie konsentrasies standaardoplossings (2 , $0,5$ en $0,1 \text{ mmol/l}$) gebruik om reaksies saam te stel soos vir die bepaling van die totale puriene of uriensuur in urine (sien Afdeling 4.2), behalwe dat die standaardoplossings die urienmonster vervang het. Die reaksiemengsels is telkens verdun om te verseker dat die eindkonsentrasie in die kuvet binne die aanvaarbare grense val, soos bepaal in Afdeling 3.3.3. Die bepalings is telkens twee keer herhaal en die gemiddelde waardes en standaardafwyking van die gemiddelde is bereken en

uiteengesit in Tabel 4.6 en Figure 4.15 tot 4.18.

Hierna is die konsentrasie totale puriene en uriensuur in die urine waar die standaardoplossings bygevoeg is, bepaal (met ander woorde na die belading). Die voorbereiding van die urine vir die bepaling van die totale puriene en uriensuur tydens hierdie beladingstoets word in Tabel 4.5 uiteengesit. Totale puriene en uriensuur is in duplikaat bepaal soos in Afdeling 4.2 beskryf en uiteengesit is in Tabel 4.2. Die resultate word in Tabel 4.6 en Figure 4.15 tot 4.18 uiteengesit.

Teoreties word verwag dat die verskille tussen die konsentrasie totale puriene en uriensuur in die standaardoplossings en die konsentrasie totale puriene en uriensuur in die standaardoplossings plus urine gelyk behoort te wees aan die konsentrasie totale puriene en uriensuur in die urienmonster D alleen, soos bepaal in Afdelings 4.2.3 en 4.2.4. Hierdie verskil is daarom bepaal en uiteengesit in Tabel 4.6 en Figure 4.15 tot 4.18. Teoreties gesproke behoort hierdie verskille in konsentrasiewaardes dus binne die konsentrasiegrense $129 \pm 10 \mu\text{mol/l}$ te val vir die bepaling van totale puriene en 2859 ± 37 vir die bepaling van uriensuur (sien Afdelings 4.2.3 en 4.2.4).

Hierdie verwagte waardes en die eksperimentele waardes word vervolgens vergelyk. Tydens die gebruik van die 2 mmol/l puriene (Figuur 4.15) en uriensuur (Figuur 4.18) standaardoplossings (Tabel 4.6), het die eksperimentele waardes van adenosien, hipoxantien, xantien en uriensuur ooreenstem met die verwagte waardes van die urienmonster nommer D. Die eksperimentele waardes van inosien was laer en van guanosen en guanien was hoër as die verwagte waarde van die urienmonster. Tydens die gebruik van $0,5 \text{ mmol/l}$ puriene (Figuur 4.16) en uriensuur (Figuur 4.18) standaardoplossings (Tabel 4.6), het

Tabel 4.5: Die voorbereiding van urine vir die beladingstoets.

A Bepaling van Totale Puriene

Reagens	Volume (in ul)
Urine	50
Purien standaardoplossing	50
Water	470
Glisienbuffer (glisien 0,6 mol/l) (pas pH aan tot 9.3)	125
Urikase (6 U/ml by 25°C; 14,67 U/ml by 37°C)	2,5
Meng en inkubeer by 37 °C vir ongeveer 1 uur	
<u>Vernietig Urikase :</u>	
1,6 N NaOH (pas pH aan tot 11)	80
Laat staan vir 15 minute	
<u>Neutraliseer :</u>	
1,6 N HCl	80 - 110
Tris.HCl-buffer (Tris 0,1 mol/l, fosfaat 3 mmol/l en EDTA 3 mmol/l) (pas pH aa tot 7,4)	142,5 - 112,5
Totaal : 1 ml	

B Bepaling van uriensuur

Reagens	Volume (in ul)
Urine	50
Uriensuur standaardoplossing	50
Water	900
Totaal : 1 ml	

Tabel 4.6: Die purien/uriensuur-beladingstoets.

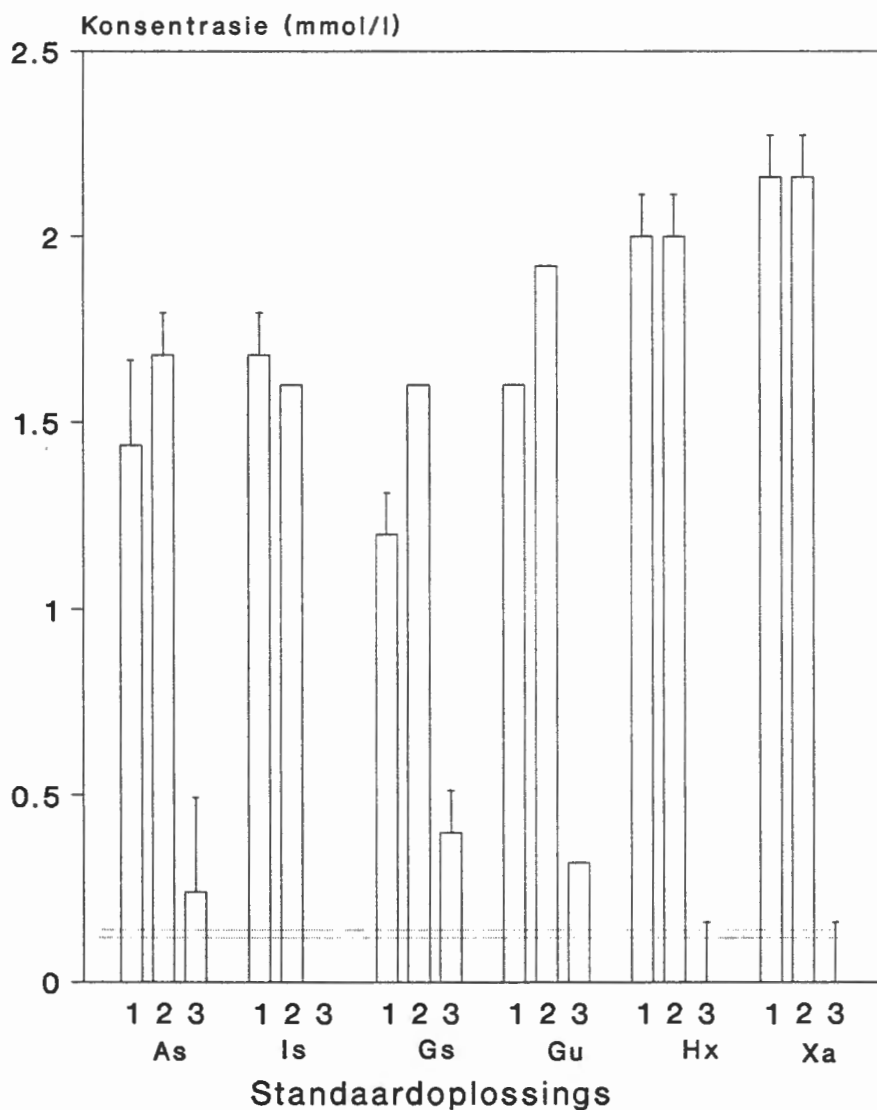
Standaard- oplossing	Konsentrasie (mmol/l)		
	sonder urine	met urine	verskil
2 mmol/l			
Adenosien	1,440 ± 0,226	1,680 ± 0,113	0,240 ± 0,253
Inosien	1,680 ± 0,113	1,600 ± 0,000	-0,080 ± 0,113
Guanosien	1,200 ± 0,113	1,600 ± 0,000	0,400 ± 0,113
Guanien	1,600 ± 0,000	1,920 ± 0,000	0,320 ± 0,000
Hipoxan-			
tien	2,000 ± 0,113	2,000 ± 0,113	0,000 ± 0,160
Xantien	2,160 ± 0,113	2,160 ± 0,113	0,000 ± 0,160
Uriensuur	2,080 ± 0,226	4,880 ± 0,339	2,800 ± 0,407
0,5 mmol/l			
Adenosien	0,400 ± 0,113	0,400 ± 0,113	0,000 ± 0,160
Inosien	0,420 ± 0,028	0,600 ± 0,057	0,180 ± 0,064
Guanosien	0,340 ± 0,028	0,580 ± 0,028	0,240 ± 0,040
Guanien	0,500 ± 0,028	0,640 ± 0,000	0,140 ± 0,028
Hipoxan-			
tien	0,500 ± 0,028	0,640 ± 0,000	0,140 ± 0,028
Xantien	0,560 ± 0,000	0,660 ± 0,028	0,100 ± 0,028
Uriensuur	0,520 ± 0,057	3,600 ± 0,566	3,080 ± 0,569
0,1 mmol/l			
Adenosien	0,108 ± 0,017	0,248 ± 0,011	0,140 ± 0,020
Inosien	0,072 ± 0,011	0,248 ± 0,011	0,176 ± 0,016
Guanosien	0,088 ± 0,011	0,248 ± 0,011	0,160 ± 0,016
Guanien	0,104 ± 0,034	0,248 ± 0,011	0,144 ± 0,036
Hipoxan-			
tien	0,108 ± 0,017	0,268 ± 0,017	0,160 ± 0,024
Xantien	0,108 ± 0,017	0,284 ± 0,006	0,176 ± 0,018
Uriensuur	0,144 ± 0,023	3,600 ± 0,113	3,456 ± 0,115

Die volgende waardes word aangedui: die konsentrasie totale puriene en uriensuur in die standaardoplossings, die konsentrasie totale puriene en uriensuur in die standaardoplossings plus urine en die verskil tussen eersgenoemde twee waardes (sien Afdelings 4.5.2, 4.5.3 en 4.5.4).

die eksperimentele waardes van adenosien, inosien, guanien, hipoxantien en uriensuur volledig en xantien gedeeltelik met verwagte waardes van die urienmonster oorvleuel, terwyl die eksperimentele waardes van guanosien hoër as die verwagte waardes van die urienmonster was. Tydens die gebruik van 0,1 mmol/l puriene (Figuur 4.17) en uriensuur (Figuur 4.18) standaardoplossings (Tabel 4.6), oorvleuel die eksperimentele waardes van adenosien en guanien volledig en hipoxantien gedeeltelik met die verwagte waardes van die urienmonster, terwyl die eksperimentele waardes van inosien, guanosien, xantien en uriensuur ietwat hoër as die verwagte waardes van die urienmonster is.

Uit die resultate (Tabel 4.6 en Figure 4.15 tot 4.18) is waargeneem dat indien urine met lae (0,1 mmol/l) en matige (0,5 mmol/l) konsentrasies puriene belaaï word, die berekende konsentrasie waardes óf binne die verwagte waardes geval het, óf 'n effense afwyking van die verwagte waardes getoon het. By belading van urine met hoë konsentrasies (2 mmol/l) puriene het die eksperimentele waardes soms binne dieselfde grense geval, maar meestal het dit baie afgewyk van die verwagte waardes. Indien urine met hoë (2 mmol/l) tot matige (0,5 mmol/l) konsentrasies uriensuur belaaï is, het die berekende en verwagte waardes redelik ooreengestem, veral by die hoë konsentrasie uriensuur. Waar lae konsentrasies (0,1 mmol/l) uriensuur egter gebruik is, het die eksperimentele en verwagte waardes aansienlik verskil.

Uit ondervinding is agtergekom dat hoe groter die konsentrasie in die urine, hoe groter moet die verdunning wees om te verseker dat die konsentrasie in die kuvet binne die gebied (0 tot 25 $\mu\text{mol/l}$) bly waarin totale puriene optimaal bereken kan word (sien Afdeling 3.3.3). Die foutgrens wat ontstaan as gevolg van die verdunning van die urienmengsel kan teoreties bereken word indien in ag geneem word dat die deteksielimiet van die spektrofotometer 1 $\mu\text{mol/l}$ is. Die foutgrens van 'n verdunning sal dan



Figuur 4.15: Resultate van die purienbelading van urienmonster D met 2 mmol/l purien standarde.

As: adenosien

Is: inosien

Gs: guanosien

Gu: guanien

Hx: hipoxantien

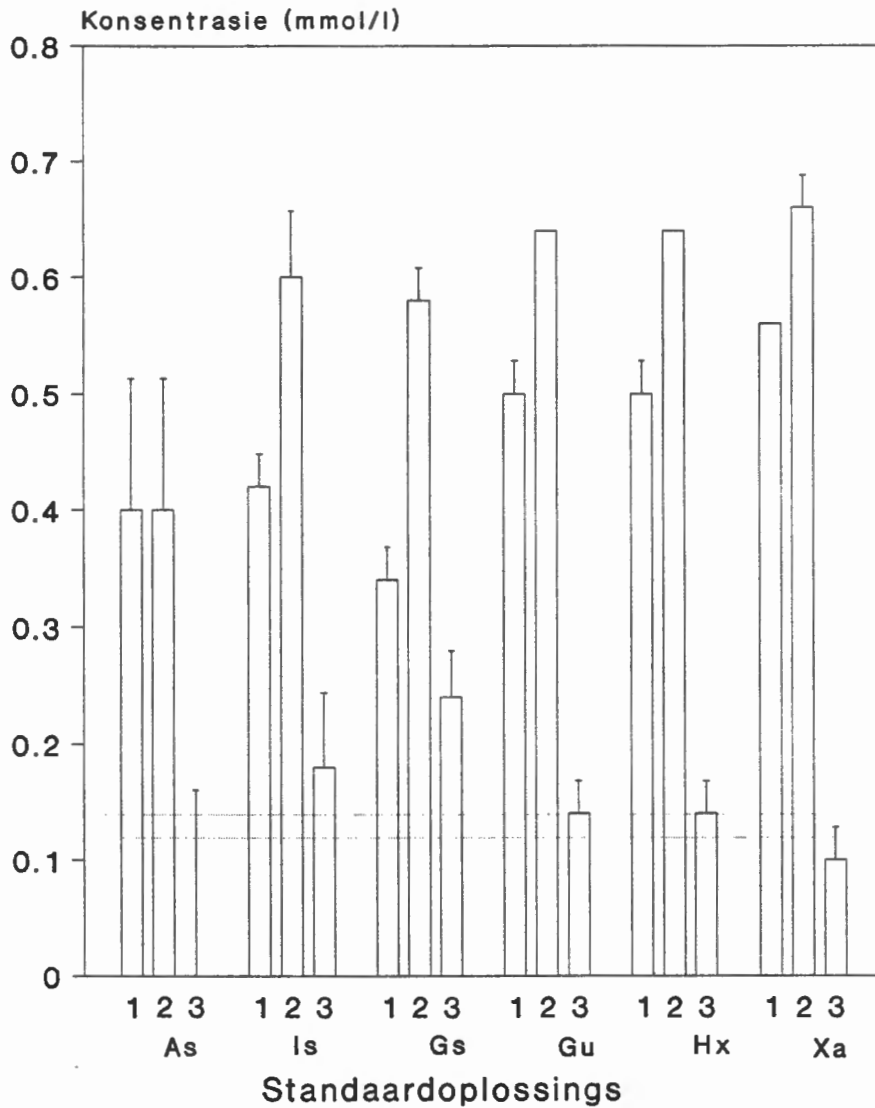
Xa: xantien

Stippellyn: grense van purieninhoud van D

1: standaardoplossing afzonderlik

2: standaardoplossing plus urine

3: die verskil tussen 1 en 2



Figuur 4.16: Resultate van die purienbelading van urienmonster D met 0,5 mmol/l purien standaardde.

As: adenosien

Is: inosien

Gs: guanosen

Gu: guanien

Hx: hipoxantien

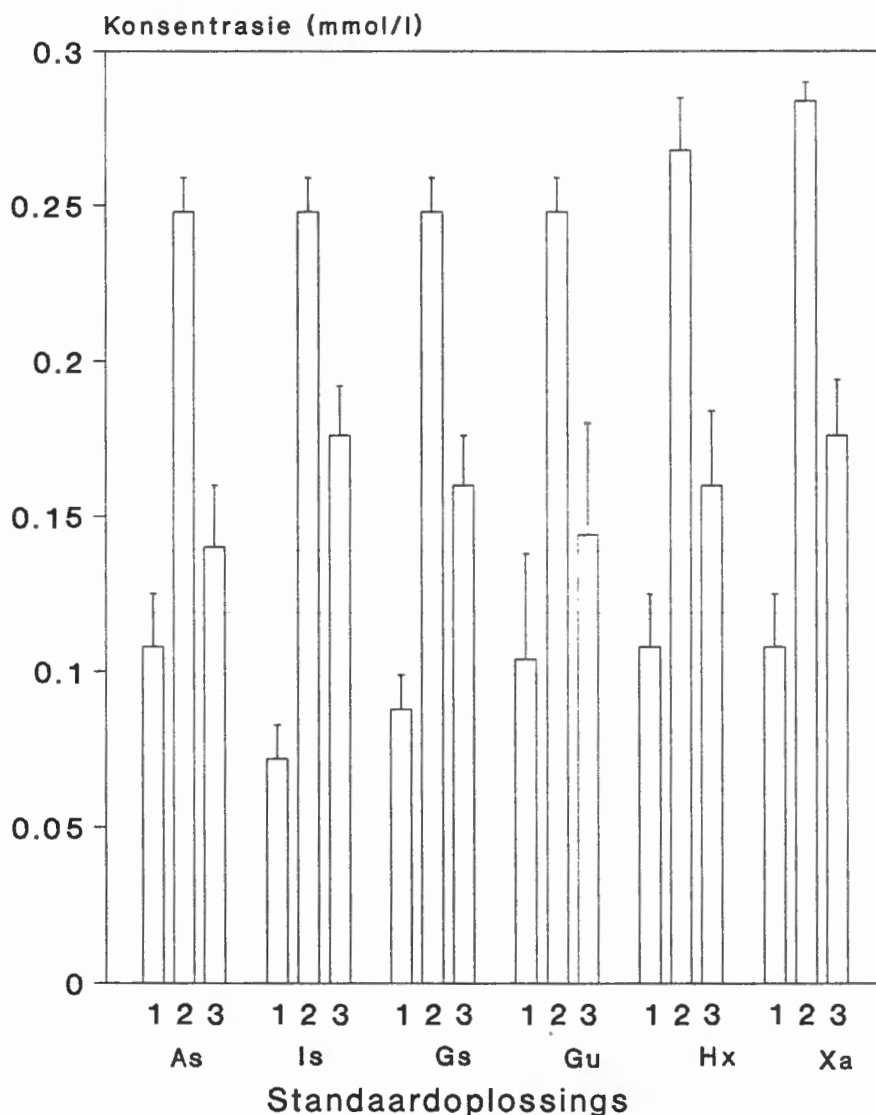
Xa: xantien

Stippellyn: grense van purieninhoud van D

1: standaardoplossing afsonderlik

2: standaardoplossing plus urine

3: die verskil tussen 1 en 2



Figuur 4.17: Resultate van die purienbelading van urienmonster D met 0,1 mmol/l purien standdaarde.

As: adenosien

Is: inosien

Gs: guanosien

Gu: guanien

Hx: hipoxantien

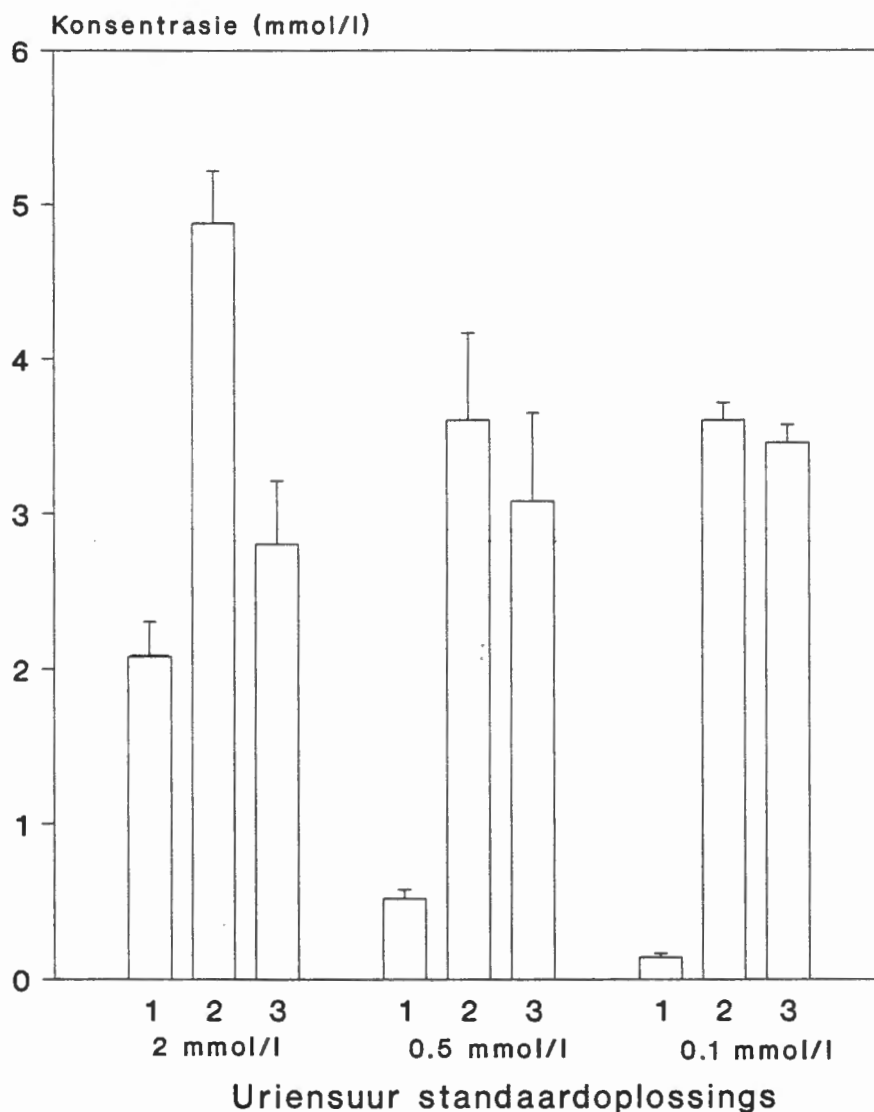
Xa: xantien

Stippellyn: grense van purieninhoud van D

1: standaardoplossing afsonderlik

2: standaardoplossing plus urine

3: die verskil tussen 1 en 2



Figuur 4.18: Resultate van die purienbelading van urienmonster D met uriensuur standaarde.

Stippellyn: grense van purieninhoud van D
 1: standaardoplossing afsonderlik
 2: standaardoplossing plus urine
 3: die verskil tussen 1 en 2

gelyk wees aan die verdunningsfaktor vermenigvuldig met die deteksielimiet. Dus hoe groter die verdunning wat gebruik moet word, hoe groter is die foutgrens wat ontstaan as gevolg van die verdunning. Aangesien die konsentrasie uriensuur in die kontrole-urine reeds hoog is, moet 'n groot verdunning gebruik word, wat veroorsaak dat die foutgrens groot is. Indien daar dan 'n klein hoeveelheid uriensuur bygevoeg word, kan dit moeilik bepaal word, aangesien dit binne die foutgrens kan val. Die konsentrasie totale puriene in kontrole-urine is weer laag ten opsigte van die konsentrasie uriensuur, en daarom word 'n kleiner verdunning van die urine benodig. Die foutgrens is daarom kleiner vir die bepaling van totale puriene. Indien 'n klein hoeveelheid puriene bygevoeg word, sal dit die foutgrens nie veel verander nie. Indien egter baie puriene bygevoeg word, sal 'n groter verdunning gebruik moet word as tydens die bepaling van die totale puriene in die urienmonster alleenlik. Die foutgrens word dus sodanig verhoog dat die oorspronklike konsentrasie totale puriene binne hierdie foutgrens kan val. Daarom kan die oorspronklike konsentrasie totale puriene in hierdie gevalle moeilik bepaal word.

4.6. BESPREKING

In hierdie hoofstuk is beskryf hoe die konsentrasie totale puriene en uriensuur in urine bepaal kan word deur 'n gestandaardiseerde metode soos beskryf in Hoofstuk 3 te gebruik. Hierdie metode, soos in Afdelings 4.3 en 4.4 beskryf, is toegepas op 'n aantal kontrole-urienmonsters waaruit normaalgrense vir totale puriene en uriensuur bepaal is, naamlik 0,115 tot 1,772 mmol/l per mg kreatinien vir totale puriene en 1,135 tot 12,812 mmol/l per mg kreatinien vir uriensuur (Tabelle 4.3 en 4.4 onderskeidelik).

Dieselfde metode is gebruik vir die bepaling van totale puriene en uriensuur in die urine van persone met rele-

vante metaboliese defekte. Uit die resultate (Tabelle 4.3 en 4.4 en Figure 4.1 tot 4.14) is afgelei dat die defekte PNP-defek en molibdeenkofaktor-tekort, deur gebruik te maak van hierdie metode, geïdentifiseer kan word as abnormaal, aangesien dit afwyk van die normaalgrense. Dit stem ooreen met wat verwag is, aangesien hipoxantienkonsentrasie by molibdeenkofaktor-tekort verhoog word, inosien- en guanosienkonsentrasies by PNP-defek verhoog word en hipoxantienkonsentrasie by xantienurien verhoog word, wat telkens tot 'n verhoogde purienkonsentrasie lei, en uriensuurkonsentrasie by al drie defekte verlaag word. Daar is oorspronklik verwag dat ADA-defek ook opgespoor sou kon word as gevolg van die opeenhoping van adenosien. Aangesien slegs een urienmonster beskikbaar was, is dit egter moeilik om 'n afleiding te kan maak oor die identifiseerbaarheid van hierdie defek. Ook is verwag dat Lesch-Nyhausindroom (as gevolg van die opeenhoping van uriensuur) en xantienurie (as gevolg van die opeenhoping van xantien) opgespoor sou kon word. (Hierdie gegewens is verkry na bestudering van die defekte, sien Afdeling 2.2). Om hierdie probleem op te volg is 'n verdere benadering tot resultaatverwerking ondersoek wat in die besprekingshoofstuk uiteengesit word.

Die reaksietye van die reaksies gekataliseer deur die ensiemmengsel was 5 tot 25 minute, behalwe by urienmonsters 5a en 5b waar dit 40 tot 70 minute was. Hierteenoor was die reaksietye 10 tot 20 minute, behalwe by die urienmonster 5c waar dit 10 tot 30 minute was, vir die reaksies gekataliseer deur urikase. Die afbraak van die totale puriene in die urine van die persone met PNP-defek (5a, 5b en 5c) was stadiger as in ander urienmonsters, moontlik as gevolg van die ophoping van guanosien waarmee reeds in Hoofstuk 3 probleme ondervind is.

Die metode is ook verder getoets deur die grense van die totale puriene en uriensuur te varieer, deur beladings van verskillende konsentrasies (2, 0,5 en 0,1 mmol/l) van

al die puriene en uriensuur onderskeidelik by die urine te voeg (Afdeling 4.5). Hieruit is waargeneem dat die eksperimentele waardes totale puriene nader ooreenstem aan die verwagte waardes indien minder as 0,5 mmol/l puriene by die urine gevoeg is. Die eksperimentele waardes uriensuur het weer nader ooreengestem aan die verwagte waardes indien meer as 0,1 mmol/l uriensuur by die urine gevoeg is. 'n Moontlike rede hiervoor is dat hoe hoër die konsentrasie in die urine, hoe groter is die verdunning wat benodig word om die konsentrasie in die kuvet binne die gebied te hou waar totale puriene en uriensuur optimaal bepaal kan word (sien Afdeling 3.3.3). Hoe groter die verdunning dus, hoe groter is die fout-grens wat ontstaan as gevolg van die deteksielimiet van die spektrofotometer. Indien die verdunning baie groot is, kan klein veranderinge in konsentrasies moeilik waargeneem word. Uriensuurkonsentrasies in kontrole-urine is gewoonlik hoog en daarom kan klein toevoegings moeilik bepaal word. By groot toevoegings van puriene word die konsentrasie totale puriene weer so veel verhoog dat die oorspronklike klein konsentrasie totale puriene moeilik bepaal kon word.

HOOFSTUK 5

BESPREKING

5.1. INLEIDING

In hierdie hoofstuk word bespreek in watter mate die doelstellings van hierdie studie, naamlik om 'n metode te standaardiseer vir die ensimatiese bepaling van die totale puriene in urine met die doel om 'n siftingstegniek te vestig waarmee persone met puriendefekte geïdentifiseer kan word, bereik is. Eerstens word die standaardisering van die metode kortliks bespreek. Daarna word die aanpassing van die metode vir gebruik in urine bespreek. Daar word ook krities na die verwerking van die data gekyk, asook na moontlike verbeterings van die metode met die oog op outomatisering in die toekoms.

5.2. STANDAARDISERING VAN DIE METODE

Uit die literatuur (Afdeling 3.2) is verskeie metodes en tegnieke verkry wat vir die bepaling van die totale puriene in urine gebruik kon word. Slegs één metode is egter verkry waardeur die totale hoeveelheid puriene in 'n enkele ondersoek bepaal kon word. Hierdie ensimatiese metode, wat sover bekend nog nie gestandaardiseer is vir gebruik in urienmonsters nie, is verder ondersoek en gestandaardiseer (sien Hoofstuk 3).

Die eerste faktor wat tydens die standaardisasie van die metode in ag geneem is, was die pH. Volgens Jensen (1985: 101-110) werk die metode die beste in twee pH-gebiede. Die stapsgewyse afbraak van die puriene tot uriensuur deur die werking van vier ensieme (ADA, PNP, guanase en XOD) gesamentlik of afsonderlik, het die beste geskied by 'n pH van 7.4. Die bepaling van die hoeveelheid uriensuur deur die afbraak daarvan na allantofien deur die werking van urikase spektrofotometries te monitor, het weer die beste plaasgevind by 'n pH van 9.3. (Afdeling 3.3.1). Ty-

dens die standaardiseringsproses is vasgestel dat die ensieme wel optimaal in hierdie pH-gebiede werk, en is daar geen veranderinge hieraan aangebring nie.

Nog 'n faktor wat tydens die standaardisering in ag geneem is, was die oplosbaarheid van die puriene. Daar is gevind dat sommige van die puriene swak oplosbaar is, en dat dit beter oplos in alkaliese en/of verhitte oplossings. Verder is ook gevind dat die ensiemreaksies by 37°C die beste verloop.

Die ensiemkonsentrasies is ook tydens die ondersoek aangepas, en daar is gevind dat die enigste ensiem wat nie voldoende aktiwiteit het by die gekose konsentrasies nie, guanase was. Hierdie ensiem is egter duur en slegs in klein hoeveelhede beskikbaar. Die ensiem se substrate guanien en (indirek) guanosen, is ook gewoonlik net in klein hoeveelhede in urine teenwoordig. Daarom sou dit nie koste-effektief wees om dié ensiem se konsentrasie te verhoog en daardeur die koste baie te verhoog ter wille van 'n minimale verhoging in reaksiesnelheid nie. Die finale ensiemkonsentrasies wat vasgestel is, is in Tabel 3.3 uiteengesit. Hierdie ensiemkonsentrasies, indien die aantal ensiemeenhede (U) van elk in ag geneem word, is teoreties meer as voldoende om 'n betreklik groot aantal puriene in die gegewe tyd af te breek.

Daar is ook gevind dat dit geen verskil aan die eindresultate gemaak het indien die eerste vier ensieme (ADA, PNP, guanase en XOD) as 'n eenheid of stapsgewys apart bygevoeg is nie. Dit was wel minder moeite en minder tydrowend om die ensieme as 'n eenheid by te voeg. Verder het Jensen (1985:101-110) gestel dat die enigste stof wat 'n inhibeerder van enige van die ensieme is, waterstofperoksied is wat XOD inhibeer. As gevolg van die moontlike invloed van waterstofperoksied wat tydens die ensiemreaksies van XOD en urikase gevorm word, kon die metode slegs uitgevoer word by lae purienkonsentrasies waar min waterstofperoksied gevorm word en dit nog nie 'n

merkbare invloed op die reaksie het nie.

Om die metode te toets is purienstandaardreekse gebruik as toetsmonsters in 'n konsentrasiegebied van 0 tot 50 $\mu\text{mol/l}$. Hierdie konsentrasiegebied is volgens gegewens uit die literatuur 'n werkbare gebied vir die ensimatisiese afbraak van puriene. Daar is gevind dat die resultate 'n hoë mate van akkuraatheid en herhaalbaarheid gehad het, veral by lae konsentrasies puriene (Figuur 3.3, Afdeling 3.3.3). Die persentasie ooreenstemming is saam met die resultate in Tabel 3.2 aangedui. Die reaksies gekataliseer deur die eerste vier ensieme (ADA, PNP, guanase en XOD) het gesamentlik 10 tot 30 minute in die konsentrasiegebied 0 tot 25 $\mu\text{mol/l}$ en 30 tot 40 minute in die konsentrasiegebied 25 tot 50 $\mu\text{mol/l}$ geneem. Die reaksie gekataliseer deur urikase het tussen 5 tot 25 minute in die hele konsentrasiegebied geneem.

Die totale puriene en uriensuur is verder in standaardoplossing van individuele purienoplossings wat elk 'n konsentrasie van 50 $\mu\text{mol/l}$ gehad het, bepaal. Tydens hierdie gedeelte van die ondersoek is die eerste vier ensieme óf afsonderlik stapsgewys bygevoeg óf as 'n eenheid. Die doel van die afsonderlike stapsgewyse byvoeging van die ensieme was om te bepaal hoe vinnig die afsonderlike reaksies verloop, asook die tyd wat dit neem, indien 'n betreklik hoë konsentrasie van die afsonderlike puriene afgebreek moet word. Die resultate hiervan is opgesom in Figuur 3.4, Tabel 3.4 en Afdeling 3.3.4. Weer eens is 'n hoë mate van akkuraatheid en herhaalbaarheid verkry. Die persentasie ooreenstemming is in Tabel 3.4 aangedui. Daar is gevind dat die ensieme ADA en PNP binne 5 minute, XOD tussen 5 en 15 minute, urikase tussen 5 en 25 minute en guanase meer as 60 minute geneem het. Dus was dit weer eens duidelik dat guanase die totale reaksie vertraag, maar egter net by hoë konsentrasies guanien of guanosien.

Dit alles dui daarop dat die metode wel suksesvol gebruik kan word vir die bepaling van totale puriene en uriensuur in standaardoplossings binne 'n konsentrasiegebied van 0 tot 50 $\mu\text{mol/l}$.

5.3. BEPALING VAN TOTALE PURIENE EN URIENSUUR IN URINE

Soos in Hoofstuk 4 bespreek, is die metode soos in Hoofstuk 3 beskryf aangepas vir die bepaling van die totale puriene en uriensuur in urine. Om dit te toets, is 'n kontrolegroep (vyftien persone) asook groepe met ADA-defek (een), adenilosuksinase-defek (vyf), Lesch-Nyhansindroom (drie), molibdeenkofaktor-tekort (vyf), PNP-defek (drie), OCT-defek (vyf) en xantienurie (vier) gebruik om vas te stel of hierdie metode gebruik kan word om totale puriene en uriensuur in urine te bepaal. Die metode wat gebruik is, word in Tabelle 4.1 en 4.2 (Afdeling 2.2) opgesom.

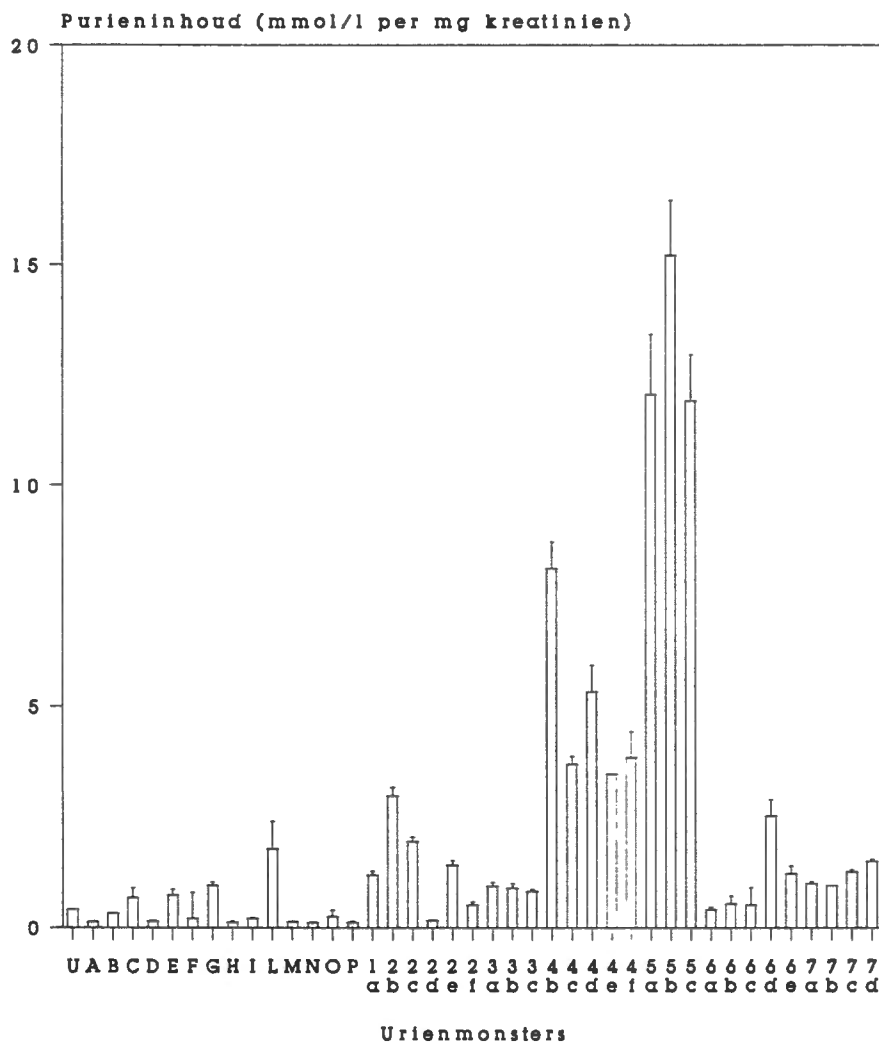
5.3.1. BEPALING VAN TOTALE PURIENE IN URINE

Tydens die bepaling van die totale puriene in kontrole-urine, is waargeneem dat die waardes binne 'n gebied van 0,115 tot 1,772 mmol/l per mg kreatinien val met 'n gemiddelde waarde van $0,418 \pm 0,458$ mmol/l per mg kreatinien. Geen waardes kon uit die literatuur verkry word om hiermee te vergelyk nie. Uit die resultate (Afdeling 4.3, Tabel 4.3 en Figure 4.1 tot 4.7) is afgelei dat daar wel, deur slegs purienkonsentrasie te vergelyk met normaalwaardes, waargeneem kan word dat persone met PNP-defek en molibdeenkofaktor-tekort 'n puriendefek het, aangesien die gemiddelde waardes wat vir die onderskeie defekte verkry is, hoër is as die normale grense. Die waardes van persone met ADA-defek, adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhansindroom, OCT-defek en xantienurie oorvleuel egter met die normale grense. Daar kan dus nie deur die bepaling van totale puriene in urine aangetoon word dat sulke persone 'n puriendefek het nie. 'n Gesamentlike beeld van die resultate van al die urienmonsters

word in Figuur 5.1 voorgestel.

5.3.2. BEPALING VAN URIENSUUR IN URINE

Tydens die bepaling van uriensuur in kontrole-urinemonsters is waargeneem dat die waardes binne 'n gebied van 1,135 tot 12,812 mmol/l per mg kreatinien val met 'n gemiddelde waarde van $6,011 \pm 3,178$ mmol/l per mg kreatinien. Volgens Newcombe (1975: 6) is uriensuurvlakke in serum vir 'n vrou normaalweg onder 5 mg per 100 ml ($\pm 297,4$ $\mu\text{mol/l}$) en vir 'n man normaalweg onder 6 mg per 100 ml ($\pm 356,9$ $\mu\text{mol/l}$) en vir beide geslagte normaalweg bo 3 mg per 100 ml ($\pm 178,4$ $\mu\text{mol/l}$). Hierdie lesings is verkry met kolorometriese metodes en indien ensimatiese spektrofotometriese metodes gebruik word, neem die waardes toe met ongeveer 1 mg per 100 ml ($\pm 59,5$ $\mu\text{mol/l}$). Normale waardes wissel dus tussen 237,9 $\mu\text{mol/l}$ en 416,4 $\mu\text{mol/l}$. Die waardes wat deur Newcombe (1975: 6) verkry is, val dus onder die grense in hierdie studie verkry. Daar moet in ag geneem word dat Newcombe (1975: 6) se uriensuurwaardes in serum gemeet is en die uriensuurwaardes in hierdie studie in urine. Uit die resultate (Afdeling 4.4, Tabel 4.4 en Figure 4.8 tot 4.14) is afgelei dat daar wel deur van hierdie metode gebruik te maak, waargeneem kan word dat persone met molibdeenkofaktor-tekort en xantienurie 'n puriendefek het, aangesien die gemiddelde waardes wat vir die onderskeie defekte verkry is, laer as die normaalgrense was. Die waardes wat verkry is by persone met ADA-defek, adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhan-sindroom, PNP-defek en OCT-defek ooreenstem met die normaalgrense, en kan daar dus nie deur die bepaling van uriensuur in die urine aangetoon word dat sulke persone 'n purien-defek het nie. 'n Gesamentlike beeld van die resultate van die bepaling van uriensuur in al die urienmonsters word in Figuur 5.2 voorgestel.



Figuur 5.1: Die konsentrasie totale puriene.

Die urienmonsters wat hier aangedui word, is soos beskryf in Afdeling 4.2.3.

Reeks U tot D: kontrolegroep

Reeks 1: ADA-defek

Reeks 2: adenilosuksinase-defek

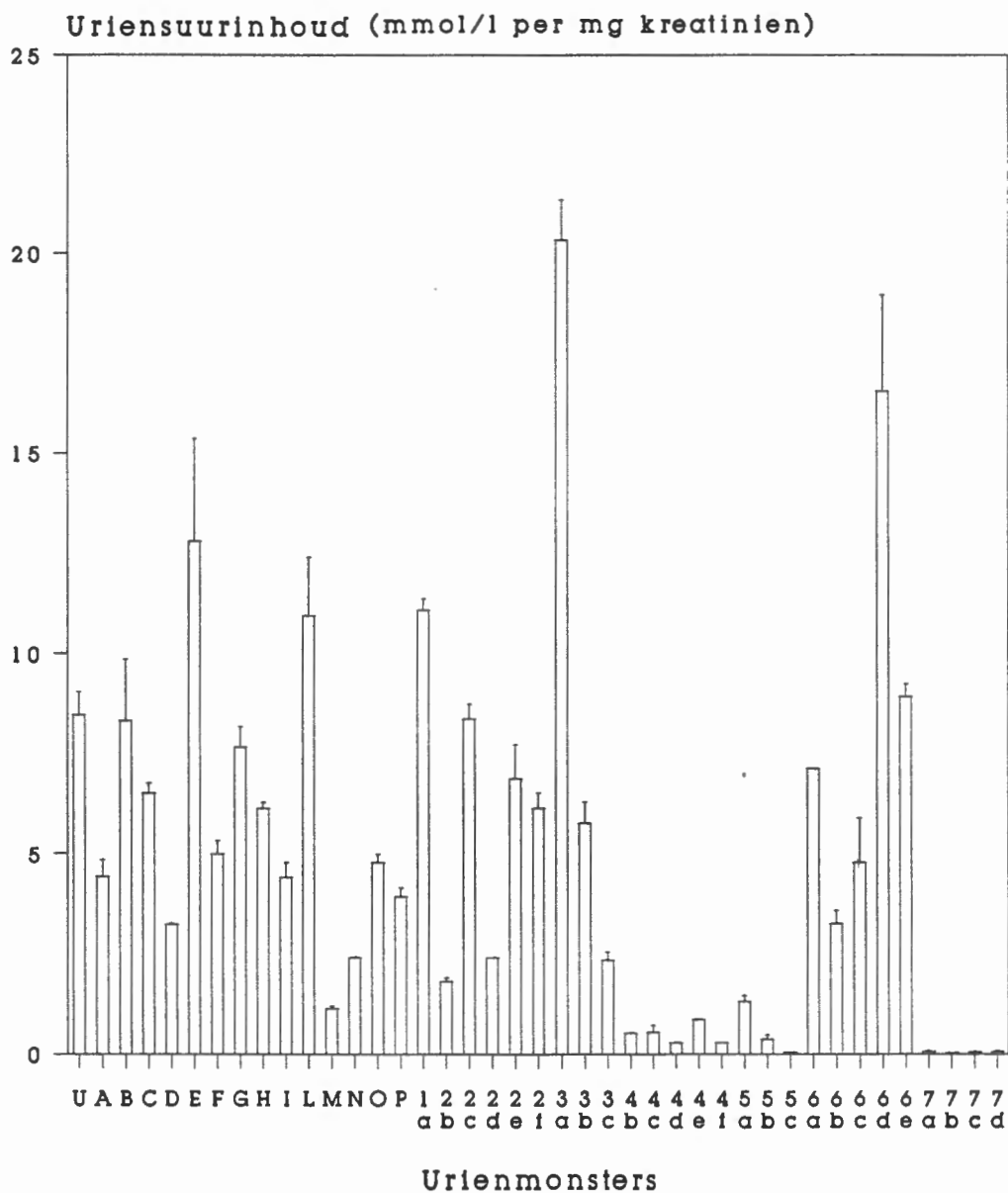
Reeks 3: Lesch-Nyhansindroom

Reeks 4: molibdeenkofaktor-tekort

Reeks 5: PNP-defek

Reeks 6: OCT-defek

Reeks 7: xantienurie



Figuur 5.2: Die konsentrasie uriensuur.

Die urienmonsters wat hier aangedui word, is dieselfde as in Figuur 5.1.

5.3.3. DIE VERHOUDING VAN DIE HOEVEELHEID TOTALE PURIENE TOT DIE HOEVEELHEID URIENSUUR

In 'n poging om beter onderskeid te tref tussen puriende-fekte en normaalwaardes is die verhouding van die totale puriene tot die uriensuur bepaal. Hierdie waarde sal teoreties ook kompenseer vir gevalle by die kontrole-urinemonsters waar 'n hoër purienmetabolisme lei tot hoër purien- en uriensuurinhoudwaardes. Geen waardes wat hierdie verhouding weerspieël kon uit die bestaande literatuur verkry word nie. Vir die berekening van hierdie verhouding is die konsentrasie totale puriene asook die konsentrasie uriensuur, as mmol/l per mg kreatinien gebruik (Tabelle 4.3 en 4.4). Die resultate word in Tabel 5.1 en Figure 5.3 tot 5.10 voorgestel.

Uit die resultate van die kontrole-urine is waargeneem dat die waardes binne 'n gebied van 0,019 tot 0,162 val met 'n gemiddelde waarde van $0,064 \pm 0,041$. Verder is waargeneem dat, deur gebruik te maak van die alternatiewe benadering, die defekte molibdeenkofaktor-tekort, PNP-defek en xantienurie 'n puriendefek het, aangesien die gemiddelde waardes wat vir die onderskeie defekte verkry is, hoër is as die normaalgrense. Die waardes van persone met ADA-defek, adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhausindroom en OCT-defek oorvleuel egter met die normaalgrense, en daar kan dus nie deur van die alternatiewe benadering gebruik te maak, aangetoon word dat sulke persone 'n puriendefek het nie.

Opsommendergewys kan dus gesien word dat die bepaling van totale puriene PNP-defek en molibdeenkofaktor-tekort kan onderskei van normaalwaardes en die bepaling van uriensuur xantienurie en molibdeenkofaktor-tekort kan onderskei van normaalwaardes. Al drie defekte kan egter van normaalwaardes onderskei word deur alternatiewelik na die verhouding tussen die totale puriene en uriensuur te kyk. Die voordeel van hierdie benadering is dat die kontrolewaardes en die waardes verkry van die drie

Tabel 5.1: Die verhouding tussen die konsentrasie totale puriene en die konsentrasie uriensuur (soos bepaal in Hoofstuk 4).

Totale puriene		Uriensuur		Verhouding	
Kontrolegroep					
U	0,403 ± 0,010	8,466 ± 0,564	0,048 ± 0,003		
A	0,131 ± 0,018	4,430 ± 0,408	0,030 ± 0,005		
B	0,317 ± 0,020	8,321 ± 1,543	0,038 ± 0,007		
C	0,676 ± 0,221	6,508 ± 0,243	0,104 ± 0,034		
D	0,146 ± 0,011	3,236 ± 0,042	0,045 ± 0,003		
E	≤0,737 ± 0,128	12,812 ± 2,562	≤ 0,058 ± 0,015		
F	0,195 ± 0,003	4,993 ± 0,337	0,039 ± 0,003		
G	0,958 ± 0,064	7,661 ± 0,511	0,125 ± 0,012		
H	0,119 ± 0,027	6,133 ± 0,137	0,019 ± 0,004		
I	0,208 ± 0,014	4,414 ± 0,368	0,047 ± 0,005		
L	1,772 ± 0,633	10,949 ± 1,456	0,162 ± 0,062		
M	0,124 ± 0,016	1,135 ± 0,070	0,109 ± 0,016		
N	0,115 ± 0,005	2,405 ± 0,021	0,048 ± 0,002		
O	0,251 ± 0,147	4,778 ± 0,220	0,053 ± 0,031		
P	<u>≤0,117 ± 0,020</u>	<u>3,928 ± 0,234</u>	<u>≤ 0,030 ± 0,005</u>		
	0,418 ± 0,458	6,011 ± 3,178	0,064 ± 0,041		
Adenosindeaminase-defek (ADA-defek)					
1a	1,189 ± 0,082	11,086 ± 0,304	0,107 ± 0,008		
Adenilosuksinase-defek					
2b	2,969 ± 0,192	1,810 ± 0,084	1,640 ± 0,131		
2c	1,935 ± 0,104	8,358 ± 0,383	0,232 ± 0,016		
2d	0,159 ± 0,017	2,402 ± 0,000	0,066 ± 0,007		
2e	1,411 ± 0,106	6,864 ± 0,851	0,206 ± 0,030		
2f	<u>0,517 ± 0,065</u>	<u>6,137 ± 0,377</u>	<u>0,084 ± 0,012</u>		
	1,398 ± 1,126	5,115 ± 2,867	0,446 ± 0,671		

Tabel 5.1: (vervolg)

Totale puriene		Uriensuur		Verhouding	
Lesch-Nyhan-syndroom					
3a	0,932 ± 0,098	20,343 ± 1,008	0,046 ± 0,005		
3b	0,895 ± 0,099	5,769 ± 0,516	0,155 ± 0,022		
3c	<u>0,815 ± 0,047</u>	<u>2,339 ± 0,214</u>	<u>0,348 ± 0,038</u>		
	0,881 ± 0,060	9,484 ± 9,560	0,183 ± 0,153		
Molibdeenkofactor-tekort					
4b	8,100 ± 0,607	< 0,528 ± 0,000	> 15,341 ± 1,150		
4c	3,682 ± 0,176	0,536 ± 0,176	6,869 ± 2,279		
4d	5,318 ± 0,607	< 0,289 ± 0,000	> 18,401 ± 2,100		
4e	3,463 ± 0,000	≤ 0,866 ± 0,000	≥ 3,999 ± 0,000		
4f	<u>3,826 ± 0,591</u>	<u>< 0,281 ± 0,000</u>	<u>> 13,616 ± 2,103</u>		
	4,878 ± 1,944	0,500 ± 0,239	11,645 ± 6,010		
Puriennukleosiedfosforilase-defek (PNP-defek)					
5a	12,051 ± 1,368	1,316 ± 0,134	9,157 ± 1,396		
5b	15,215 ± 1,255	0,361 ± 0,120	42,147 ± 14,435		
5c	<u>11,903 ± 1,049</u>	<u>< 0,043 ± 0,000</u>	<u>> 276,814 ± 24,395</u>		
	13,056 ± 1,871	0,573 ± 0,662	106,373 ± 140,782		
OCT-defek					
6a	0,409 ± 0,064	7,125 ± 0,000	0,057 ± 0,009		
6b	0,547 ± 0,166	3,261 ± 0,331	0,168 ± 0,054		
6c	0,512 ± 0,402	4,787 ± 1,096	0,107 ± 0,088		
6d	2,514 ± 0,376	16,561 ± 2,399	0,152 ± 0,032		
6e	<u>1,223 ± 0,171</u>	<u>8,919 ± 0,327</u>	<u>0,137 ± 0,020</u>		
	1,041 ± 0,884	8,131 ± 5,186	0,124 ± 0,044		

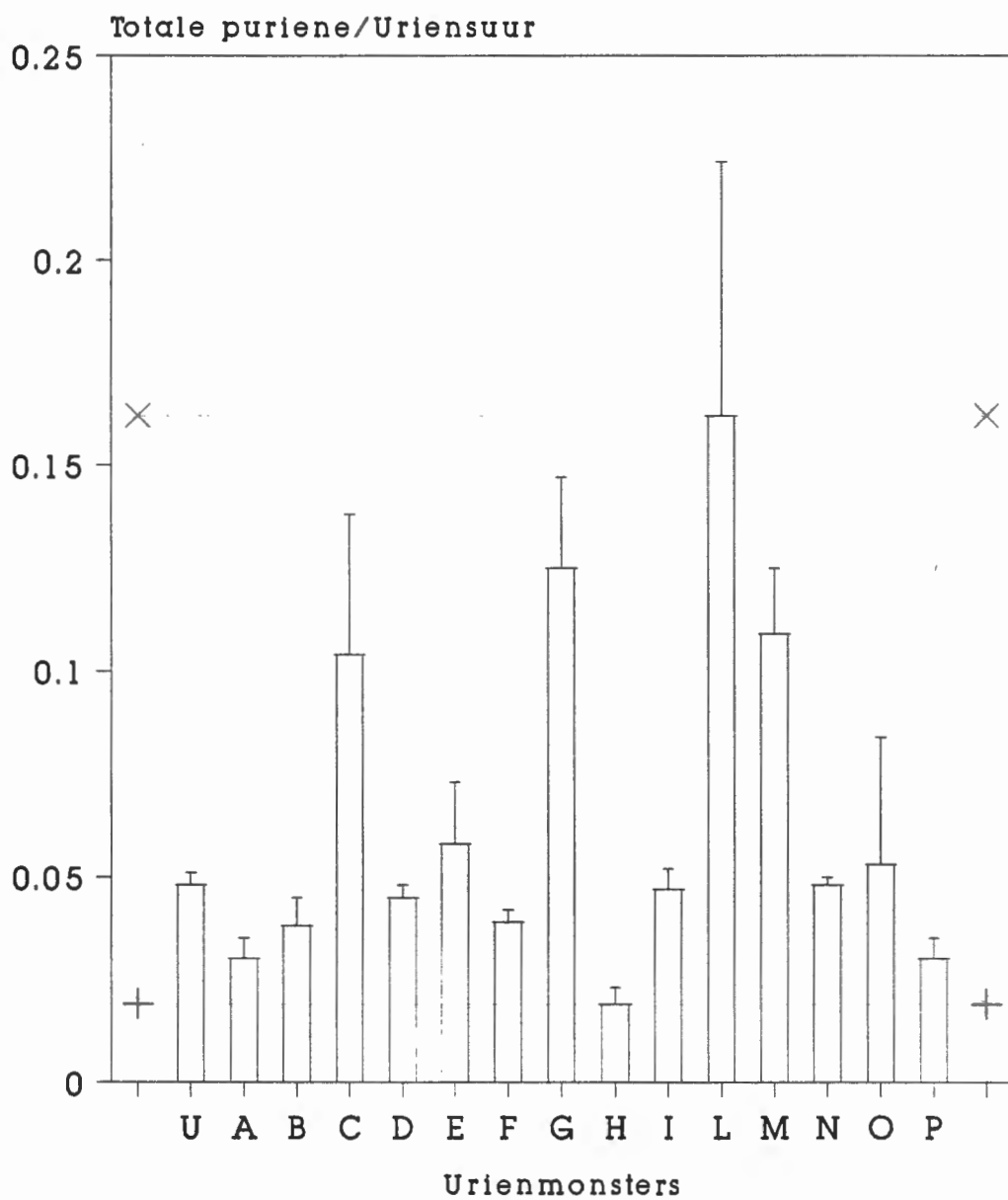
Tabel 5.1: (vervolg)

Totale puriene	Uriensuur	Verhouding
Xantienurie		
7a 1,004 ± 0,044 ≤ 0,061 ± 0,010 ≥ 16,459 ±	2,793	
7b 0,957 ± 0,000 < 0,030 ± 0,000 > 31,900 ±	0,000	
7c 1,264 ± 0,036 ≤ 0,042 ± 0,019 ≥ 30,095 ±	13,641	
7d <u>1,495 ± 0,050 ≤ 0,062 ± 0,010 ≥ 24,113 ±</u>	<u>3,972</u>	
1,180 ± 0,250 0,049 ± 0,016 25,642 ±	6,968	

(Die konsentrasie-eenhede van totale puriene en uriensuur is beide in mmol/l per mg kreatinien.)

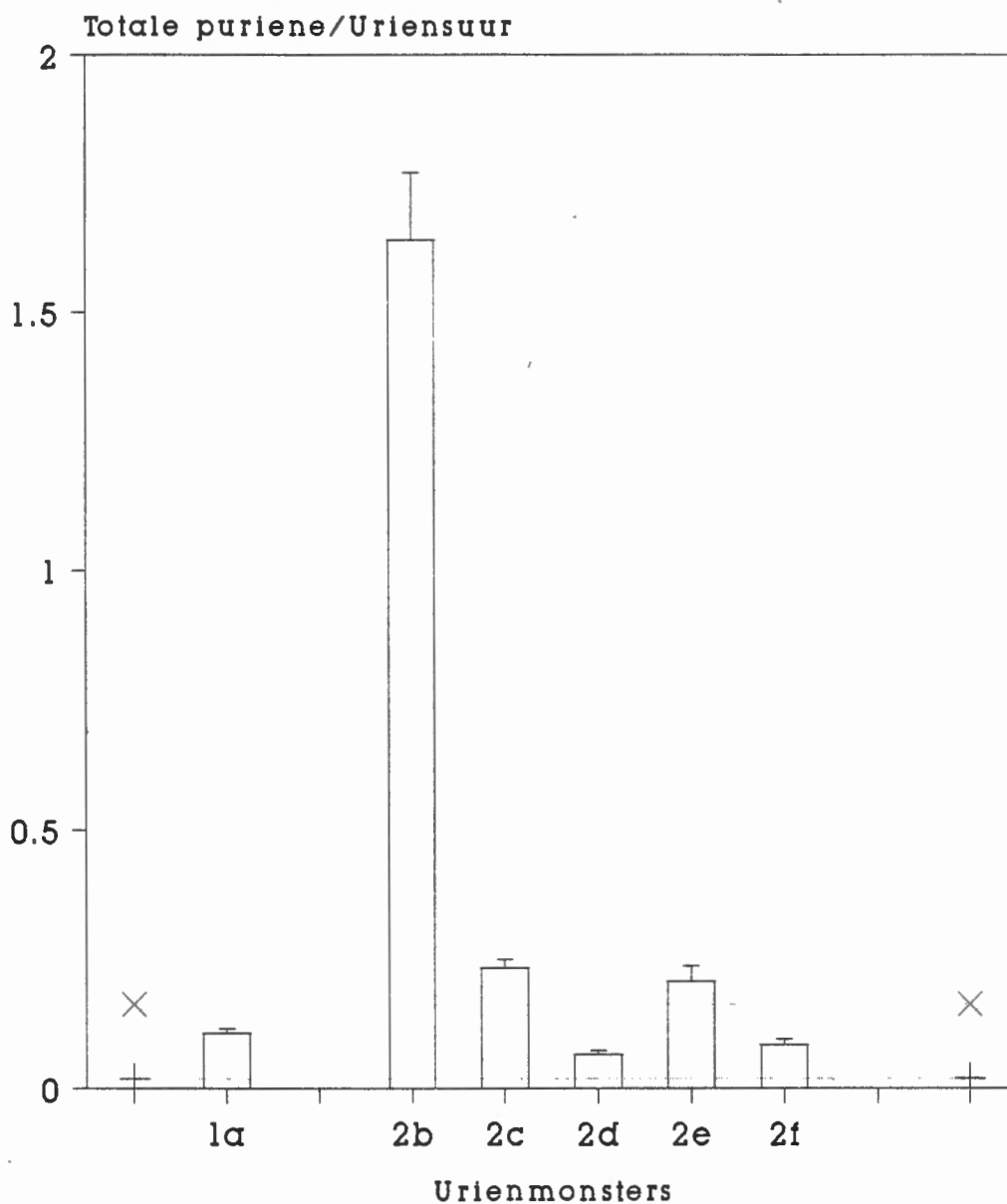
defekte radikaal verskil, in vergelyking met die kleiner verskille wat verkry word indien daar bloot na die totale puriene en uriensuur gekyk word. Die kontrole urienmonsters val ook binne nouer grense.

Indien daar na agtergrond oor die verskillende defekte (Afdeling 2.2) gekyk word, sou 'n persoon verwag dat, behalwe bogenoemde defekte, ADA-defek ook waargeneem sou kon word as gevolg van die opeenhoping van adenosien. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die adenosienkonsentrasie dalk nie voldoende toegeneem het om deur hierdie metode waargeneem te kon word nie. Adenilosuksinase-defek is nie opgespoor nie, moontlik omdat suksino-adenosien meestal ophoop, wat nie deur middel van hierdie metode ontleed kan word nie. 'n Persoon sou ook verwag om Lesch-Nyhansindroom waar te neem, as gevolg van die opeenhoping van uriensuur, hipoxantien en xantien. By adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhansindroom en OCT-defek is daar telkens een urienmonster wat duidelik bokant die normaalwaardes val, wat 'n moontlike aanduiding is dat sekere individue met hierdie defekte wel van normaalwaardes onderskei kan word, maar nie die groep as geheel nie.



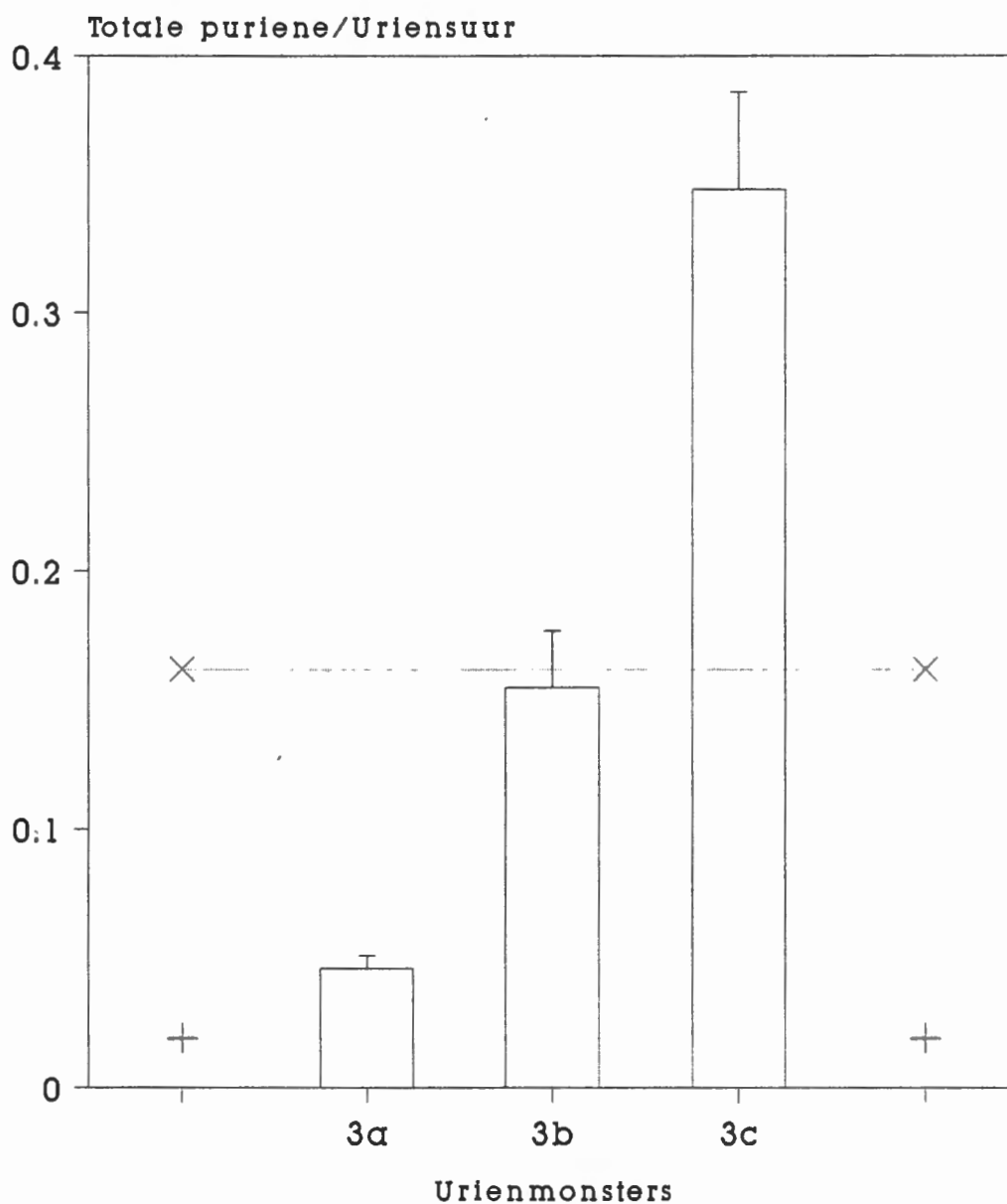
Figuur 5.3: Die verhouding totale puriëne tot uriensuur by vyftien kontrolepersone.

X — X Boonste normaalgrens
 + — + Onderste normaalgrens



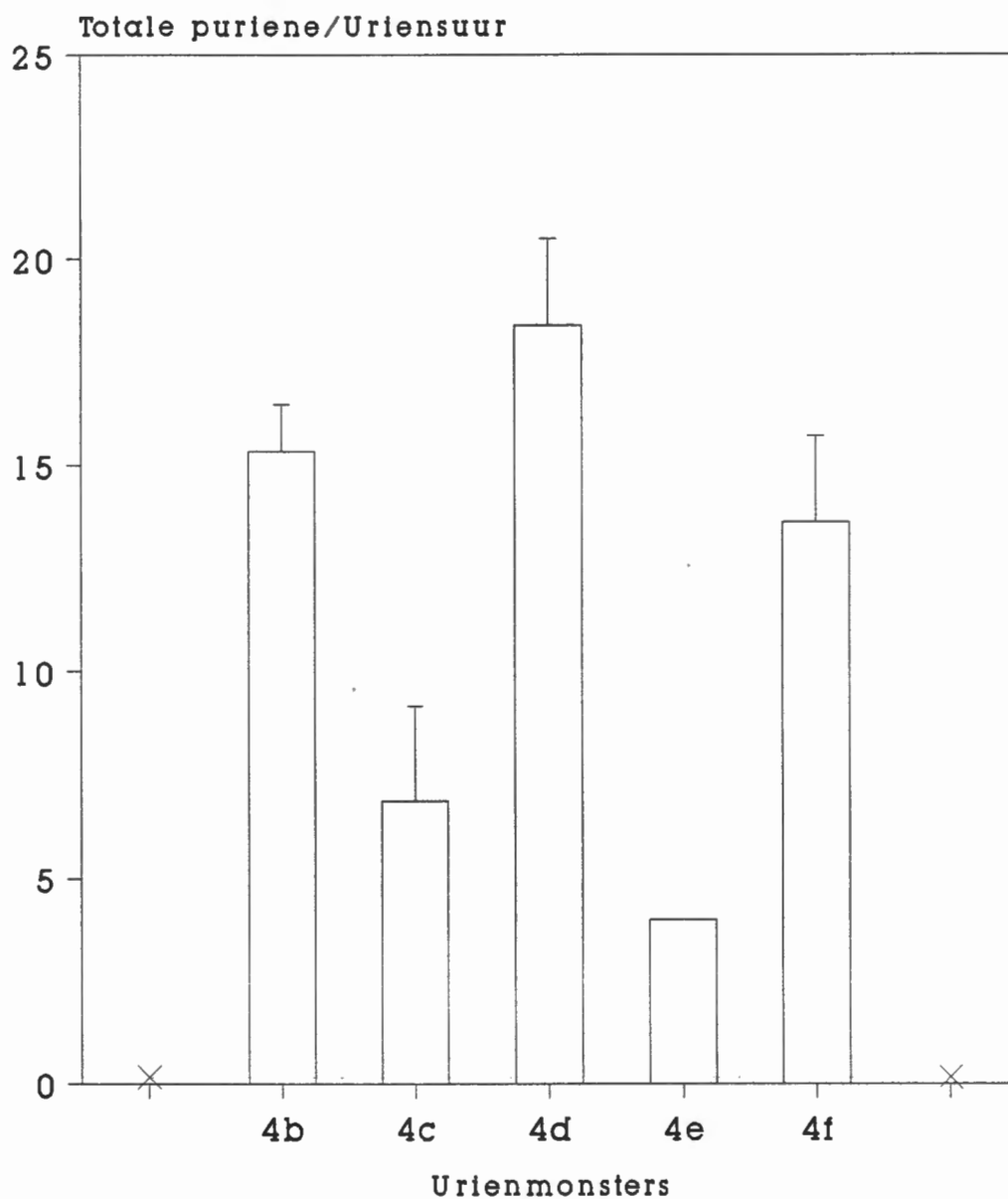
Figuur 5.4: Die verhouding totale puriene tot uriensuur by een persoon met ADA-defek en vyf persone met adenilosuksinase-defek.

X - - - X Boonste normaalgrens
 + + + Onderste normaalgrens



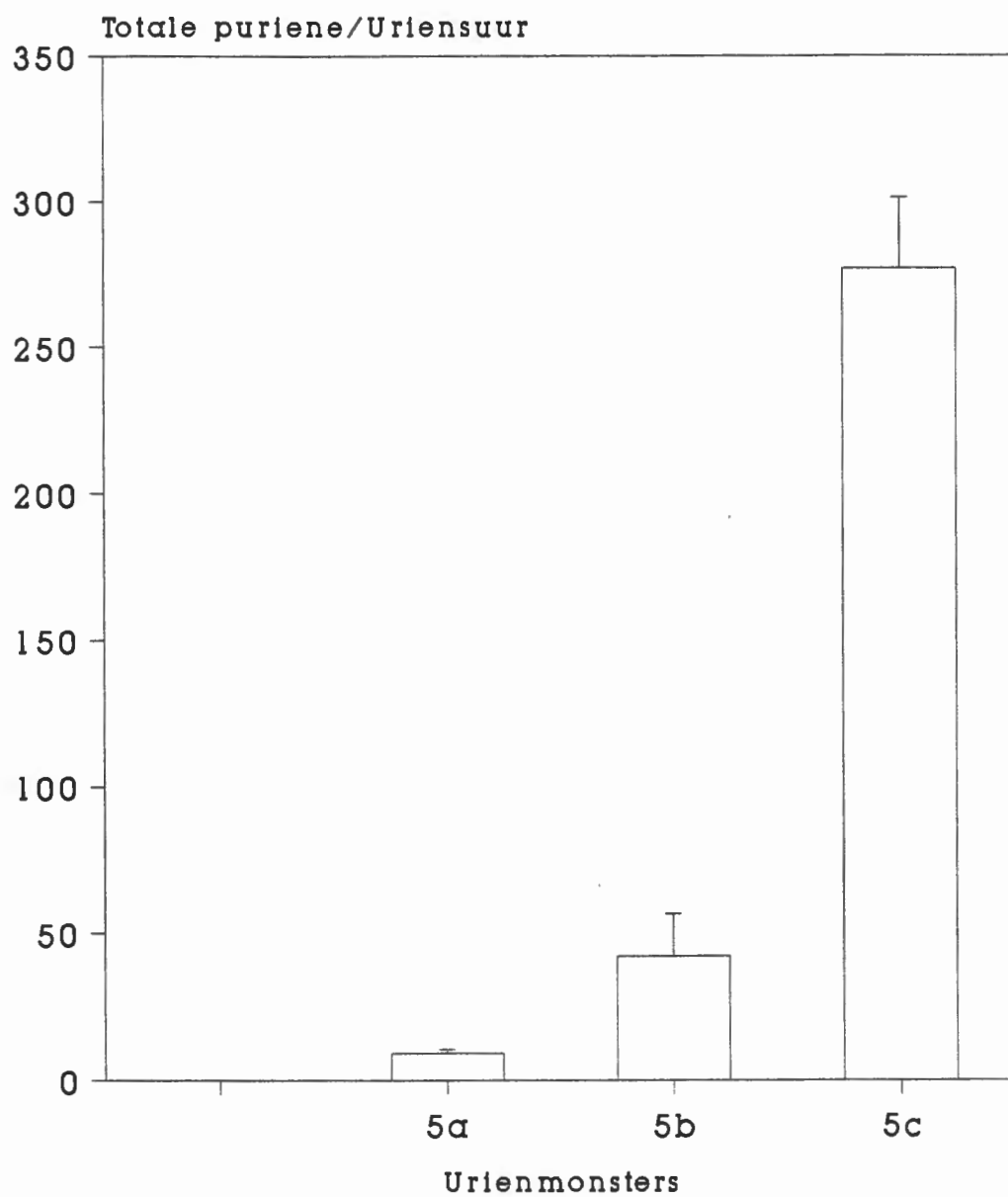
Figuur 5.5: Die verhouding totale puriene tot uriensuur by drie persone met Lesch-Nyhansindroom.

X—X Boonste normaalgrens
 +—+ Onderste normaalgrens

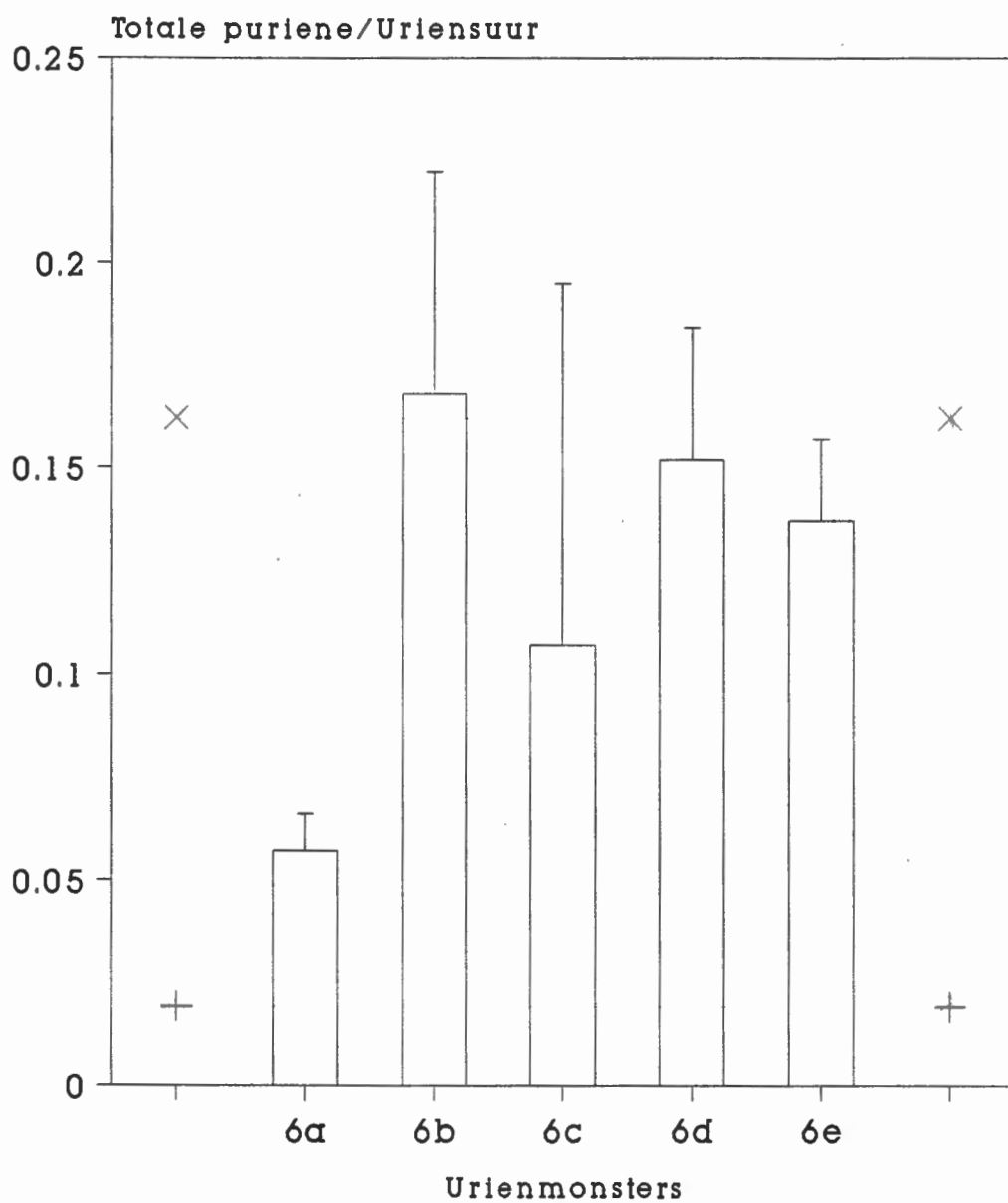


Figuur 5.6: Die verhouding totale puriene tot uriensuur by vyf persone met molibdeenkofaktor-tekort.

X — X Boonste normaalgrens

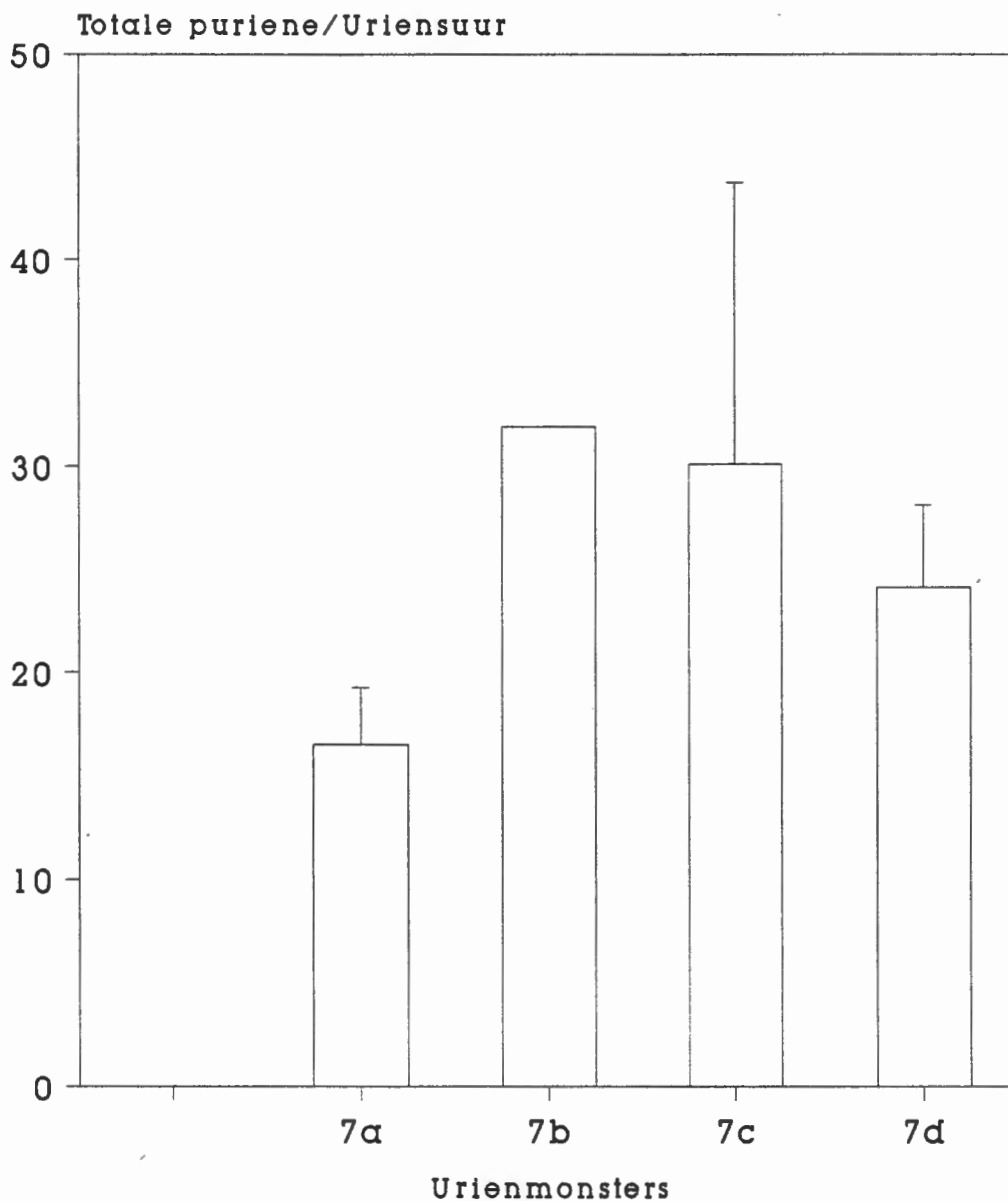


Figuur 5.7: Die verhouding totale puriene tot uriensuur by drie persone met PNP-defek.

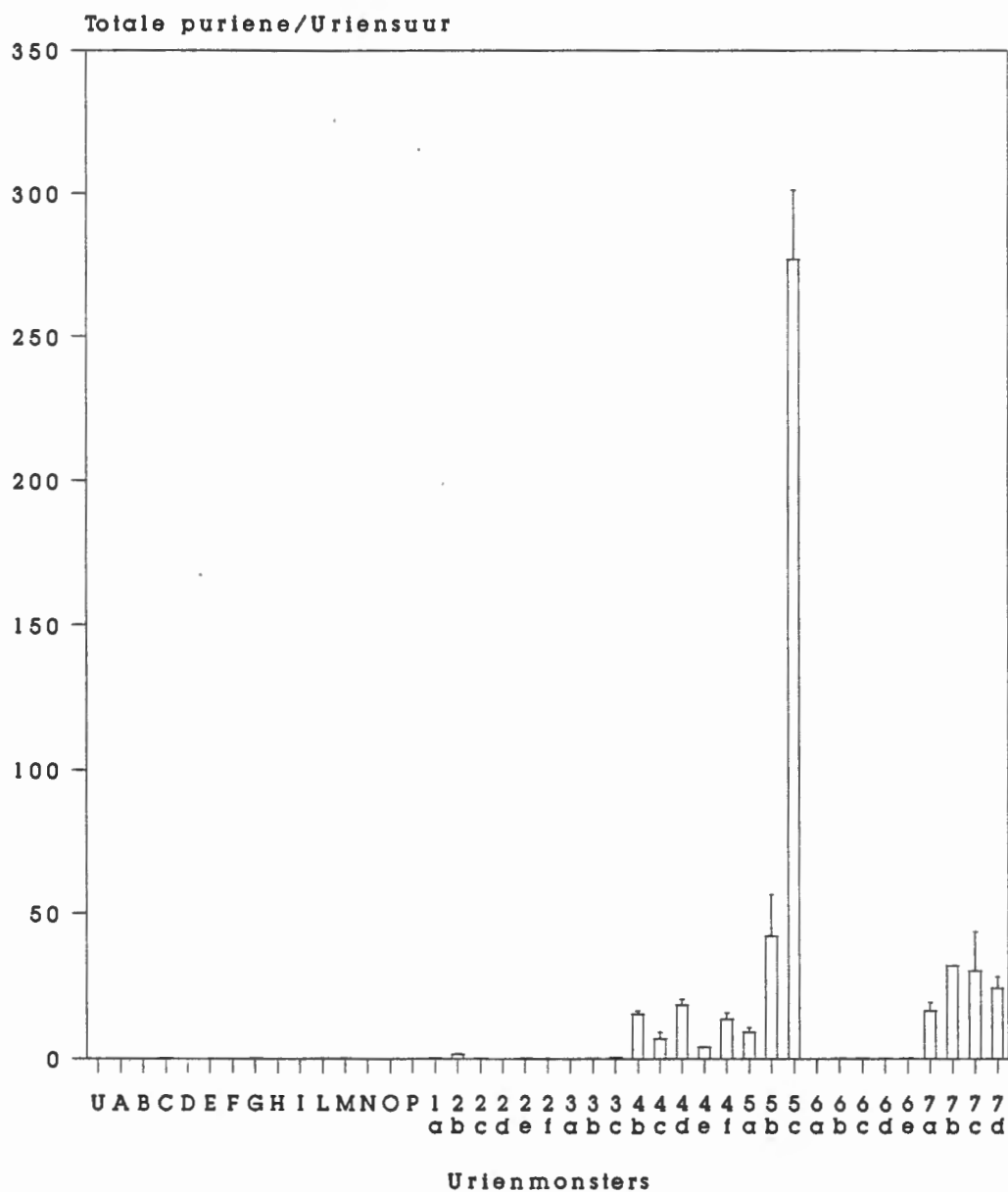


Figuur 5.8: Die verhouding totale puriene tot uriensuur by vyf persone met OCT-defek.

X — X Boonste normaalgrens
 + + Onderste normaalgrens



Figuur 5.9: Die verhouding totale puriene tot uriensuur by vier persone met xantienurie.



Figuur 5.10: Die verhouding totale puriene tot uriensuur, die urienmonsters wat hier aangedui word, is dieselfde as in Figuur 5.1.

'n Verdere aspek wat tydens die berekening van normaalgrense in ag geneem moet word, is dat 'n persoon sonder 'n defek in die purienmetabolisme wel hoë purienkonsentrasies mag toon, indien hy/sy 'n hoë puriendieet sou volg. In daardie geval sou beide die totale puriene asook uriensuur waardes hoog wees as gevolg van verhoogde purienmetabolisme. Indien daar slegs na so 'n persoon se purieninhoud en/of uriensuurinhoud gekyk sou word, kan hy verkeerdelik as 'n persoon met 'n puriendefek geïdentifiseer word. Indien daar egter na sy verhouding totale puriene tot uriensuur gekyk word, sou die waardes binne die normaalgrens val. Daar is verder ook die probleem dat persone asimptomaties jig mag hê en reeds 'n redelike hoë uriensuur en/of totale purienkonsentrasie mag hê wat die normaalgrense mag beïnvloed.

5.3.4. PURIEN-BELADINGSTOETS

Soos in Hoofstuk 4 (Afdeling 4.3) bespreek, is 'n purienbeladingstoets gedoen deur vaste hoeveelhede puriene en uriensuurstandaarde by 'n kontrole-urienmonster (D) te voeg. Dit is gedoen om te bevestig dat die metode wel sensitief is vir klein of groot veranderinge in die konsentrasie van enige purien of uriensuur in urine. Verder kan dit ook 'n aanduiding gee of daar enige faktore in die urine teenwoordig is wat die bepaling van die konsentrasie totale puriene of uriensuur kan beïnvloed. Teoreties gesproke moes die verskil tussen die waardes verkry nadat die standaarde by die urine gevoeg is en die waardes verkry vir die standaarde alleen, binne die grense van die totale puriene- en uriensuurwaardes van die betrokke urienmonster geval het soos wat vroeër bepaal is (sien Afdelings 4.2.3 en 4.2.4).

Daar is waargeneem dat lae tot matige (0,1 en 0,5 mmol/l) purienbeladings beter met die verwagte waardes ooreengestem het as hoë purienbeladings (2 mmol/l). Hierteenoor het hoë en matige uriensuurbeladings (2 en 0,5 mmol/l) beter met die verwagte waardes ooreengestem as

lae uriensuurbeladings ($0,1 \text{ mmol/l}$). Uit ondervinding is waargeneem dat hoe hoër die verdunning nodig om die konsentrasie in die kuvet binne die korrekte konsentrasiegebied (0 tot $25 \text{ } \mu\text{mol/l}$, sien Afdeling 4.2) te hou, hoe groter is die foutgrens waarmee gewerk word. (sien Afdeling 4.3)

5.4 KOSTEBEPALING VAN DIE METODE EN VERGELYKING MET DIE KOSTE VAN DIE HPLC-TEGNIK

Aangesien die doel van die studie die daarstelling van 'n siftingstegniek wat goedkoop en maklik uitvoerbaar is, word vervolgens die koste van die metode wat ondersoek is, bereken. Dit word ook verder vergelyk met die koste van die HPLC-tegniek.

In Tabel 5.2 word 'n uiteensetting gegee van die koste van een analise van een urienmonster. Volgens die tabel kos een purienanalise tussen R48 en R190 en een uriensuuranalise tussen R37 en R70. Aangesien dit beter is om 'n enkele vaste bedrag te vra vir 'n analise, word 'n gemiddelde waarde vir beide die purienanalise en die uriensuuranalise gevra, naamlik R170. Hierdie bedrag sluit dus beide 'n purienanalise en 'n uriensuuranalise van een urienmonster in.

Soos in Afdeling 3.2.1 bespreek is, kos een HPLC-analise R250. Die ensimatiese metode wat in hierdie skrywe ondersoek is, kos dus minder. Indien die metode verder aangepas sou word en die tyd wat veral die purienanalise neem verkort sou word, kan die koste van die metode verder verlaag word. Wat die koste van die metode betref, is dit dus 'n goeie siftingstegniek.

Tabel 5.2: Die kostebepaling van een purienanalise en een uriensuuranalise vir 'n enkele urienmonster.

Reagens	Hoeveelheid	Koste
Purienanalise		
Ensieme:		
Urikase	4,5 μ l	R 0,39
XOD	2 μ l	R 0,40
ADA	2 μ l	R 0,00
PNP	2 μ l	R 0,07
Guanase	4 μ l	R 2,23
	Gemiddeld	$\pm$ R 3
Buffers en ander:		weglaatbaar
Apparaat		R 20
Arbeid	R 100/uur	
ensiem-mengsel	5-70 minute	R 8-117
urikase-reaksie	1-30 minute	R 17-50
	TOTAAL:	R 48-190
	Gemiddeld	$\pm$ R 120
Uriensuuranalise		
Ensieme:		
Urikase	2 μ l	$\pm$ R 0
Buffers en ander:		weglaatbaar
Apparaat		R 20
Arbeid	R 100/uur	
urikase-reaksie	1-30 minute	R 17-50
	TOTAAL:	R 37-70
	Gemiddeld	$\pm$ R 50

5.5. VOORSTELLE VIR DIE VERBETERING VAN DIE METODE

'n Moontlike verbetering van die bestaande metode sou wees om die volledige reaksie in klein stappe op te breek en elke stap ten volle te standaardiseer en te volg by die puriene se ooreenstemmende golflengtes (sien Figuur 3.1). Die veranderings in absorpsiewaardes by die verskillende golflengtes sal direk eweredig wees aan die konsentrasies van die puriene wat lig absorbeer by daardie golflengte. Die voorvereiste wat hiervoor gestel word, is dat die invloed van die ensieme en ander stowwe, byvoorbeeld buffers, wat tydens die reaksie bygevoeg word, bepaal en in berekening gebring moet word alvorens die onderskeie puriene se konsentrasies bepaal kan word.

Die eerste stap sou die byvoeging van ADA wees, en dit behoort te lei tot 'n afname by 265 nm waar adenosien lig absorbeer. Die tweede stap sou die byvoeging van PNP wees. Dit behoort te lei tot 'n afname by 249 nm en 252 nm, waar inosien en guanosen onderskeidelik lig absorbeer. Die derde stap sou wees die byvoeging van guanase, wat tot 'n afname by 246 nm behoort te lei, waar guanien lig absorbeer. Tydens die vierde stap behoort XOD bygevoeg te word. Hier behoort sowel die afname by 250 nm, waar hipoxantien lig absorbeer, as die toename by 293 nm, waar uriensuur lig absorbeer, gemeet te word. So-doende word sowel die hoeveelheid hipoxantien wat teenwoordig was en die hoeveelheid uriensuur wat gevorm sou word, bepaal. Die hoeveelheid uriensuur wat gevorm het, is direk eweredig aan die hoeveelheid totale puriene oorspronklik teenwoordig. Om dus die hoeveelheid xantien te bepaal, moet die hoeveelhede adenosien, inosien, guanosen, guanien en hipoxantien (wat reeds bepaal is) van die hoeveelheid uriensuur wat gevorm het, afgetrek word. Die laaste stap sou wees om die hoeveelheid uriensuur te bepaal deur urikase by te voeg en die afname in uriensuur by 293 nm te volg. Die hoeveelhede van die reeds bepaalde adenosien, inosien, guanosen, guanien, hipoxantien en xantien word dan van hierdie berekende

konsentrasiewaarde afgetrek om die hoeveelheid uriensuur oorspronklik teenwoordig, te bepaal.

Indien hierdie metode gestandaardiseer sou word en die normale grense van die individuele puriene bepaal sou word, sou daar tydens die uitvoering van die metode op urine nie net bepaal word of die persoon 'n defek in sy purienmetabolisme het nie, maar ook watter defek. Die hoeveelhede van al die puriene en uriensuur sou ook in een enkele ondersoek met vyf stappe bepaal word. Daar sal ook in hierdie geval 'n groter waarskynlikheid wees dat 'n defek soos ADA-defek, wat lei tot 'n toename in adenosien, geïdentifiseer kan word. Indien die hoeveelheid adenosien, soos bepaal vir 'n persoon met die defek, vergelyk sou word met die hoeveelheid adenosien in kontrolepersone, behoort daar 'n duideliker verskil waargeneem te kan word. Ook ander defekte wat moeilik deur die metode wat in hierdie studie ondersoek is geïdentifiseer kon word, sou op hierdie wyse moontlik wel geïdentifiseer kon word.

'n Nadeel van hierdie voorgestelde metode is dat dit meer tyd in beslag kan neem en meer moeite mag wees om uit te voer. Hierdie nadele sal teen die moontlike voordele van hoë akkuraatheid, spoed en herhaalbaarheid opgeweeg moet word. Die koste van die metode behoort ook laer te wees as ander metodes en tegnieke wat tans in gebruik is, aangesien die duurste gedeelte van die metode, naamlik die ensieme, slegs in klein hoeveelhede benodig behoort te word. Die doelstelling van hierdie metode was egter om 'n kort siftingsmetode vir totale puriendefekte daar te stel, maar laasgenoemde benadering het sekere voordele al is dit lank en uitgebreid.

5.6. OUTOMATISERING

Indien die tegniek geoutomatiseer sou kon word, sou dit ideaal wees, aangesien dit dan 'n makliker en eenvoudiger siftingstegniek sou kon vorm, wat minder werk en moontlik ook tyd sou vereis as 'n tegniek wat met die hand gedoen moet word.

Die probleem met die metode wat ondersoek is, is dat sommige puriene vinnig afgebreek is en die reaksie van die begin af reglynig verloop het. Ander puriene is egter weer stadig afgebreek met min of geen reglynige verloop nie. Aangesien die tye wat die reaksies geneem het ook verskil het, kan daar nie gebruik gemaak word van outomativering nie, tensy daar 'n lang tyd gewag word voor 'n lesing geneem word. Dit kan egter die metode onnodig lank maak, veral aangesien die meeste puriene vinnig afgebreek word. 'n Ander oplossing is om die ensieme meer gekonsentreerd te maak, hoewel dit die metode weer te duur kan maak, veral aangesien die ensiem wat die stadigste reaksiesnelheid het, naamlik guanase, betreklik duur is.

Deur gebruik te maak van 'n gerekenariseerde spektrofotometer soos die Bechman DU-7500 spektrofotometer wat in die ondersoek gebruik is, kan die ondersoek aansienlik vergemaklik word. Hierdie apparaat kan geprogrammeer word om lesings op vasgestelde tye te meet. Dit kan tot 1200 lesings per minuut van 'n enkele monster neem of 'n aantal monsters (tot ses in 'n reeks) tegelykertyd. Dit kan ook die grafiek van absorbansie teenoor tyd, 'n golflengteskandering (absorbansie teenoor golflengte) of vele ander funksies verrig, sodat daar duidelik gesien kan word wanneer die reaksie(s) voltooi is. Alhoewel die byvoeging van substrate en ensieme dus nog met die hand gedoen moet word, vergemaklik dit reeds die metode aansienlik. In so 'n geval kan die metode as semi-geoutomatiseerd beskou word. Op die oomblik word hierdie apparaat gebruik soos in hierdie studie beskryf is.

5.7 SAMEVATTING

'n Ensimatiese metode vir die bepaling van totale puriene en uriensuur in die urine is in hierdie studie voorgestel en geëvalueer. Dit is gebruik vir die bepaling van die genoemde metaboliete in die kontrolegroep asook pasiënte met puriendefekte. Hiervolgens kan by die defekte molibdeenkofaktor-tekort, PNP-defek en xantienurie onderskei word tussen normale en verhoogde vlakke van puriene en/of uriensuur. Deur van die verhouding totale puriene tot uriensuur gebruik te maak, kan die genoemde drie defekte ook beter onderskei word van die kontrolewaardes. Een urienmonster elk van adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhansindroom en OCT-defek is ook van die normaalwaardes onderskeibaar deur van die verhouding totale puriene tot uriensuur gebruik te maak. Die metode kan dus as 'n siftingstegniek vir die drie defekte molibdeenkofaktor-tekort, PNP-defek en xantienurie en sommige individue met adenilosuksinase-defek, Lesch-Nyhansindroom en OCT-defek gebruik word. Die metode besit ook die potensiaal om afsonderlike defekte te identifiseer.

'n Moontlike nadeel van die metode is die lang voorbereidingstyd vir die bepaling van totale puriene, naamlik een uur vir verwydering van uriensuur, vyftien minute vir die vernietiging van urikase en ongeveer vyf minute hanteling. Indien slegs een urienmonster ontleed word, is dit nadelig. Indien meer as een monster gehanteer word, kan die voorbereiding gesamentlik gedoen word. Terwyl dit aan die gang is, kan die hoeveelheid uriensuur bepaal word, aangesien die voorbereiding eenvoudig en min moeite is. Die uriensuurbepaling is ook vinnig (5 tot 25 minute). Die totale purienbepaling is ook gewoonlik vinnig, behalwe in die gevalle waar hoë konsentrasies guanien of guanosen teenwoordig is as gevolg van die reeds genoemde probleem met guanase.

Die akkuraatheid van die metode is herhaaldelik geëvalueer en daar is duidelik vasgestel hoe akkurate, herhaalbare resultate verkry kan word.

Die bepaling van purieninhoud en uriensuurinhoud in 'n enkele urienmonster kos R170 in vergelyking met R250 vir 'n HPLC-analise (sien Afdeing 4.5). In vergelyking met die ander tegnieke wat beskryf is vir die bepaling van totale puriene, is die metode goedkoop, eenvoudig en min moeite.

DIE BEPALING VAN DIE KONSENTRASIES VAN DIE ONDERSKEIE
PURIENE IN STANDAARDOPLOSSINGS

Die bepaling van die konsentrasies van die onderskeie puriene in standaardoplossings is in Hoofstuk 3 (Afdeling 3.3.4) bespreek. In hierdie Bylae word die resultate van enkele van hierdie bepalinge kortliks aangetoon om die finale resultate (sien Figuur 3.4 en Tabel 3.4) en afleidings wat in Hoofstuk 3 gemaak is, verder te ondersteun.

A.1. DIE BEPALING VAN DIE KONSENTRASIES VAN DIE ONDERSKEIE PURIENE IN STANDAARDOPLOSSINGS, WAAR DIE ENSIEME ADA, PNP, GUANASE EN XOD AFSONDERLIK STAPSGEWYS BYGEVOEG IS

Vir die bepaling van die konsentrasie van die puriene (adenosien, inosien, xantien, guanosien en guanien) en uriensuur, waarvan die teoretiese konsentrasie $50 \mu\text{mol/l}$ is, is die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD aanvanklik afsonderlik stapsgewys bygevoeg. Op hierdie manier kon bepaal word of elke ensiem wel die geleentheid gegun is om sy bepaalde substraat of substrate na sy onderskeie produk of produkte te omvorm. (Hierdie reaksies is meestal net een keer uitgevoer.)

Die resultate kan óf as 'n golflengteskandering (absorbansie teenoor golflengte) soos in Figuur A.1, waar die lesings by verskeie tye geneem is, óf as 'n absorbansie teenoor tyd-grafiek by 'n vaste golflengte (293 nm), soos Figuur A.2, weergegee word. Laasgenoemde is verkies, aangesien die verloop van die reaksie by die verlangde golflengte (293 nm) duideliker gesien kan word. Dit is ook makliker om te sien wanneer die absorbansie ophou verander (met ander woorde wanneer aanvaar word dat die reaksie voltooi is).

Die absorbansiespektra van die bepaling van die konsentrasies van adenosien, inosien, xantien, guanosien,

guanien, uriensuur, en die blanko, word onderskeidelik in Figure A.2, A.3, A.4, A.5, A.6, A.7 en A.8 aangetoon.

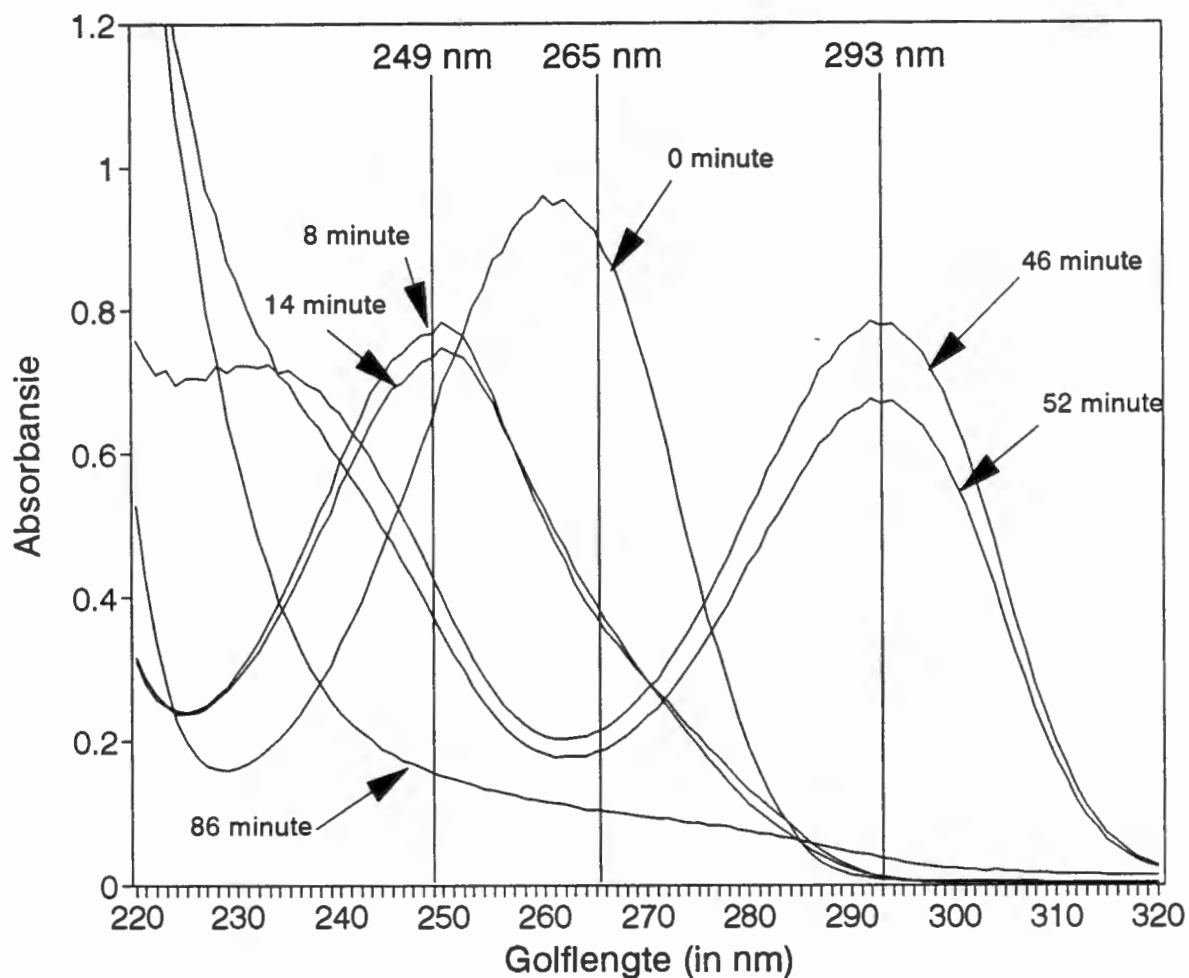
A.2. DIE BEPALING VAN DIE KONSENTRASIES VAN DIE ONDER-SKEIE PURIENE IN STANDAARDOPLOSSINGS, WAAR DIE EN-SIEME ADA, PNP, GUANASE EN XOD SAAM AS 'N EENHEID BYGEVOEG IS

Vir die bepaling van die konsentrasie van die puriene (adenosien, inosien, hipoxantien, xantien, guanosien en guanien) en die purienmengsel, waarvan die teoretiese konsentrasie $50 \mu\text{mol/l}$ was, is die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD vir hierdie deel van die ondersoek saam as 'n eenheid bygevoeg (sien Hoofstuk 3, Afdeling 3.3.4). Op hierdie manier kan finaal bepaal word of die resultate van die eksperimente waar die eerste vier ensieme afsonderlik of as 'n eenheid bygevoeg is, werklik dieselfde is.

Verder word die reaksiesnelheid van die volle eksperiment vir 'n maksimum konsentrasie ($50 \mu\text{mol/l}$) van elke purien en die purienmengsel bepaal, om die maksimum tydsverloop van die metode vas te stel.

Die absorpsiespektra van die bepaling van die konsentrasies van adenosien, inosien, hipoxantien, xantien, guanosien, guanien, purienmengsel en die blanko word onderskeidelik in Figure A.9, A.10, A.11, A.12, A.13, A.14, A.15 en A.16 uiteengesit.

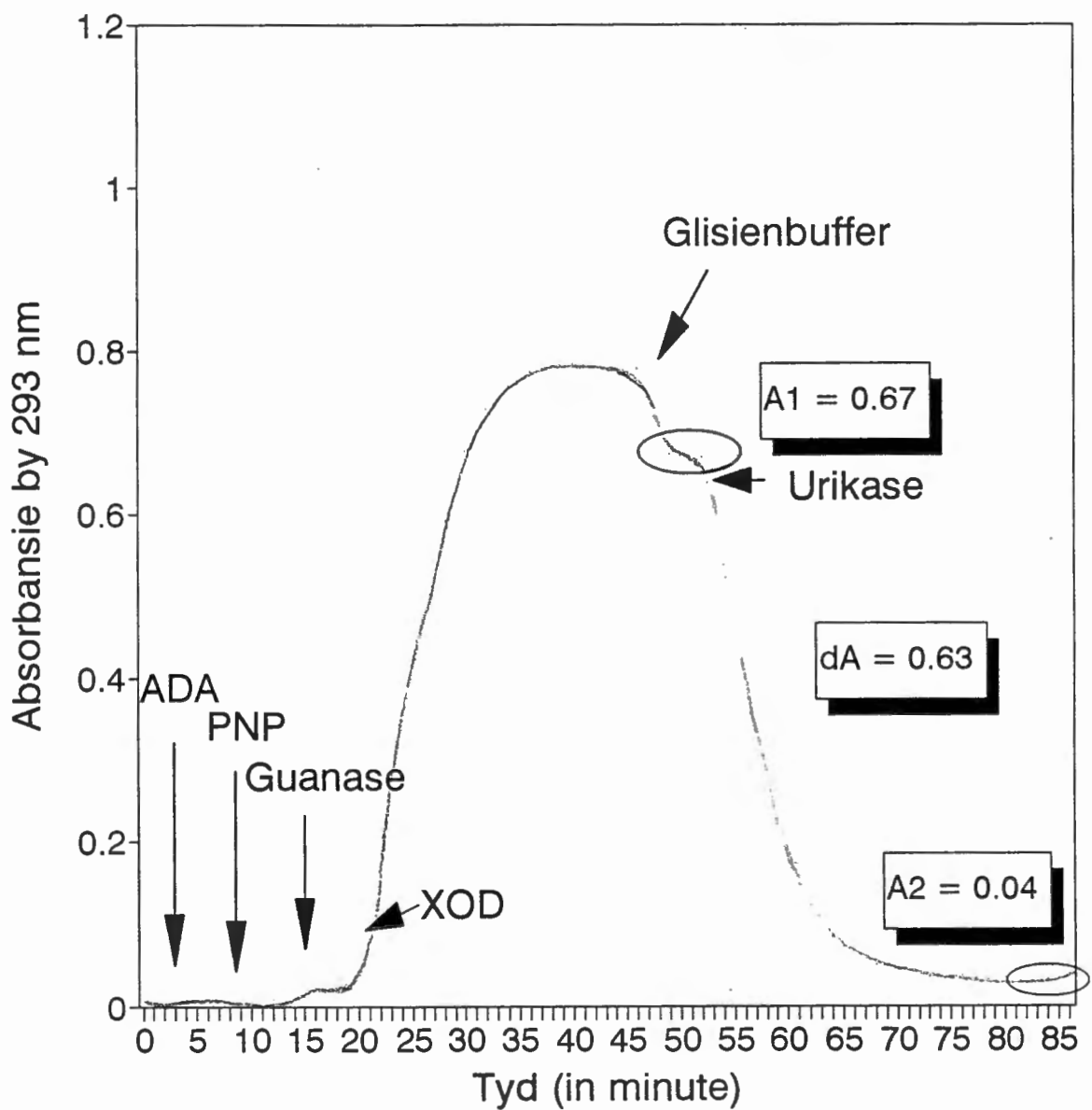
A)



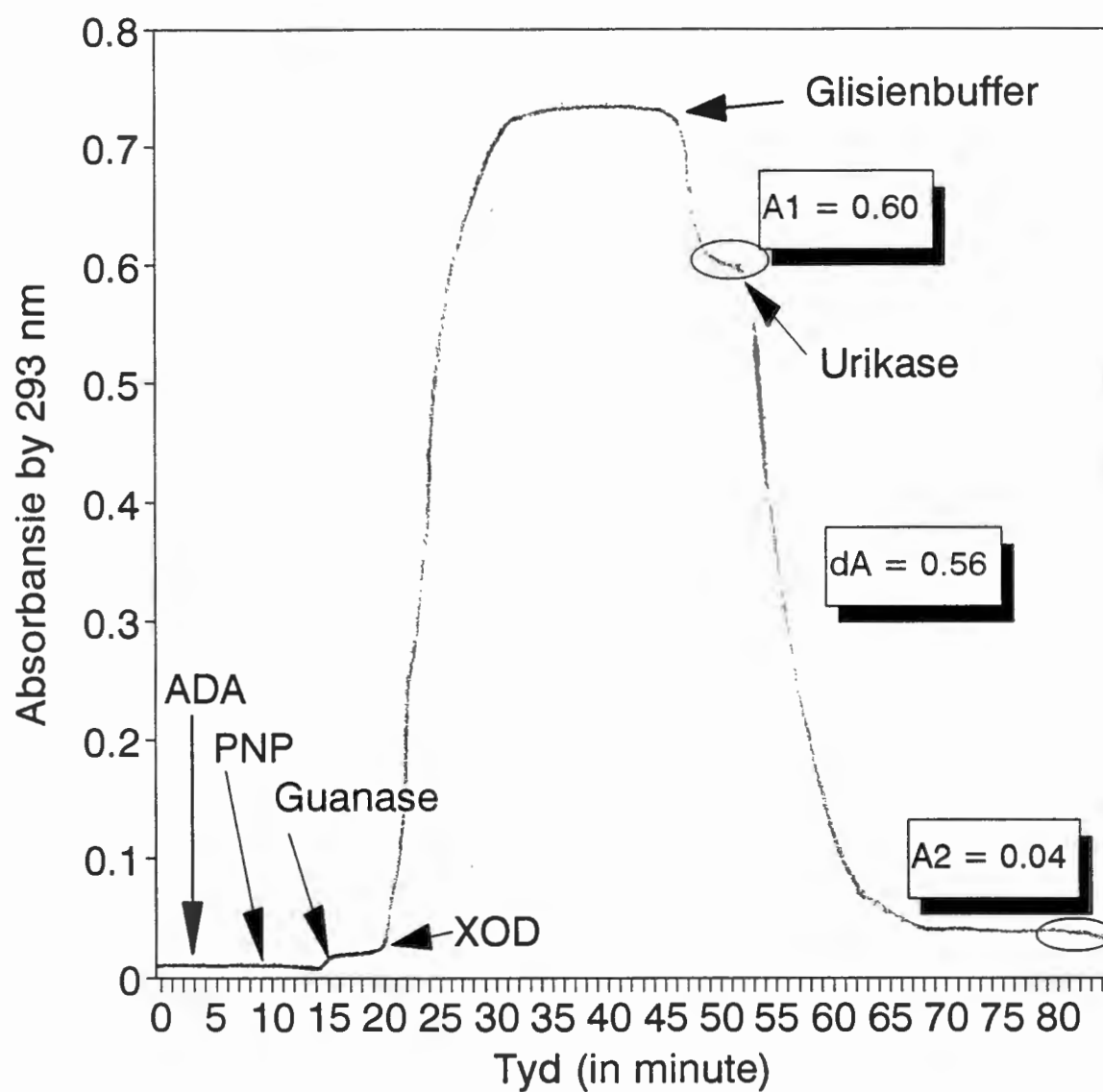
B) Absorbansielesings

Tyd	0	8	14	46	52	86
249 nm	0,652	0,768	0,734	0,426	0,373	0,156
265 nm	0,912	0,375	0,392	0,212	0,185	0,104
293 nm	0,007	0,009	0,010	0,777	0,670	0,036

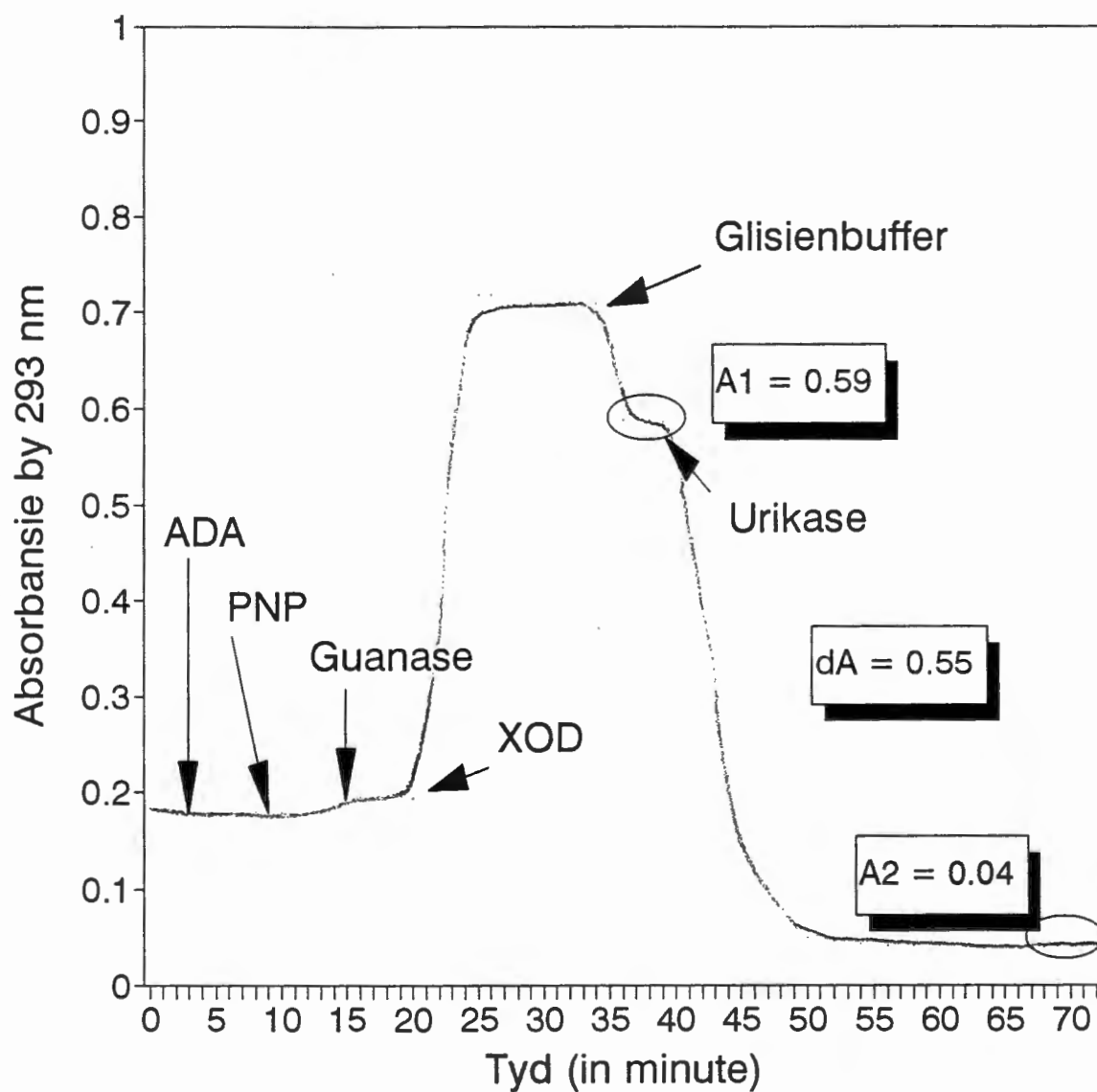
Figuur A.1: Die bepaling van die konsentrasie adenosien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg
a) Die golflengteskanderings. Die tye wanneer onderskeie lesings geneem is en die pieke by 249, 265 en 293 nm, word aangedui. b) Absorbansielesings wat by genoemde tye (in minute) en golflengtes gemeet is.



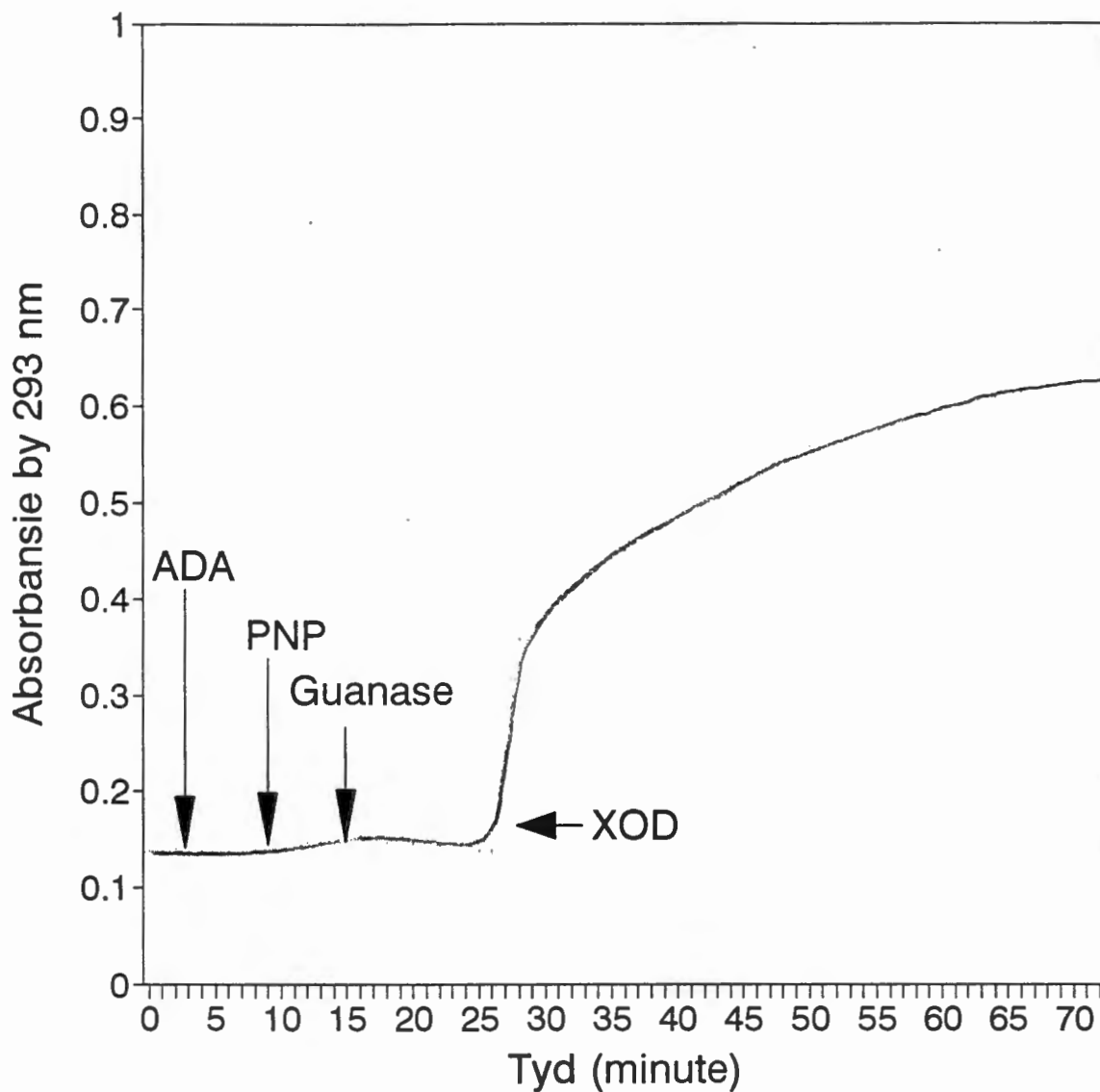
Figuur A.2: Die bepaling van die konsentrasie van adenosien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg.



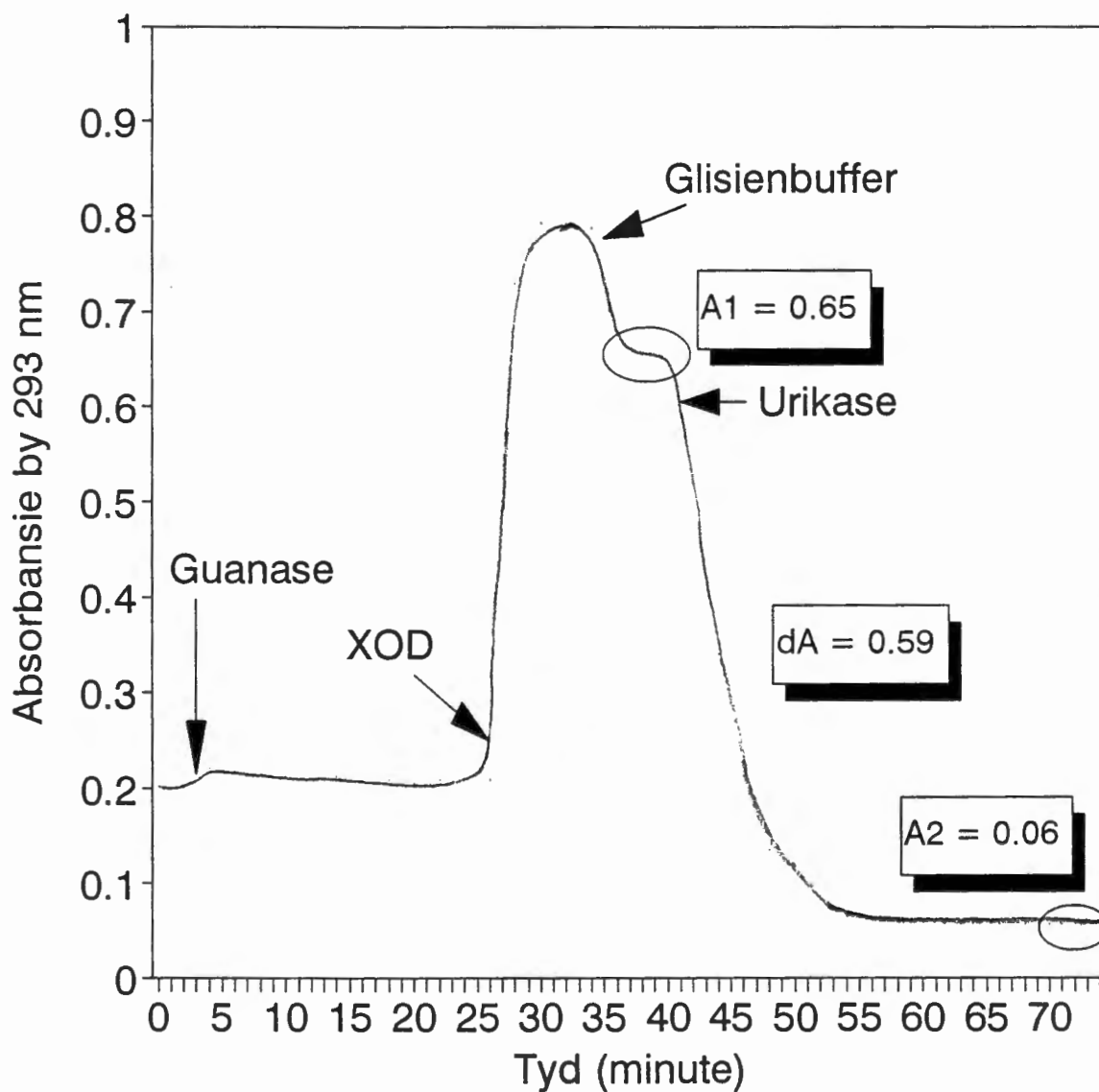
Figuur A.3: Die bepaling van die konsentrasie van inosien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg.



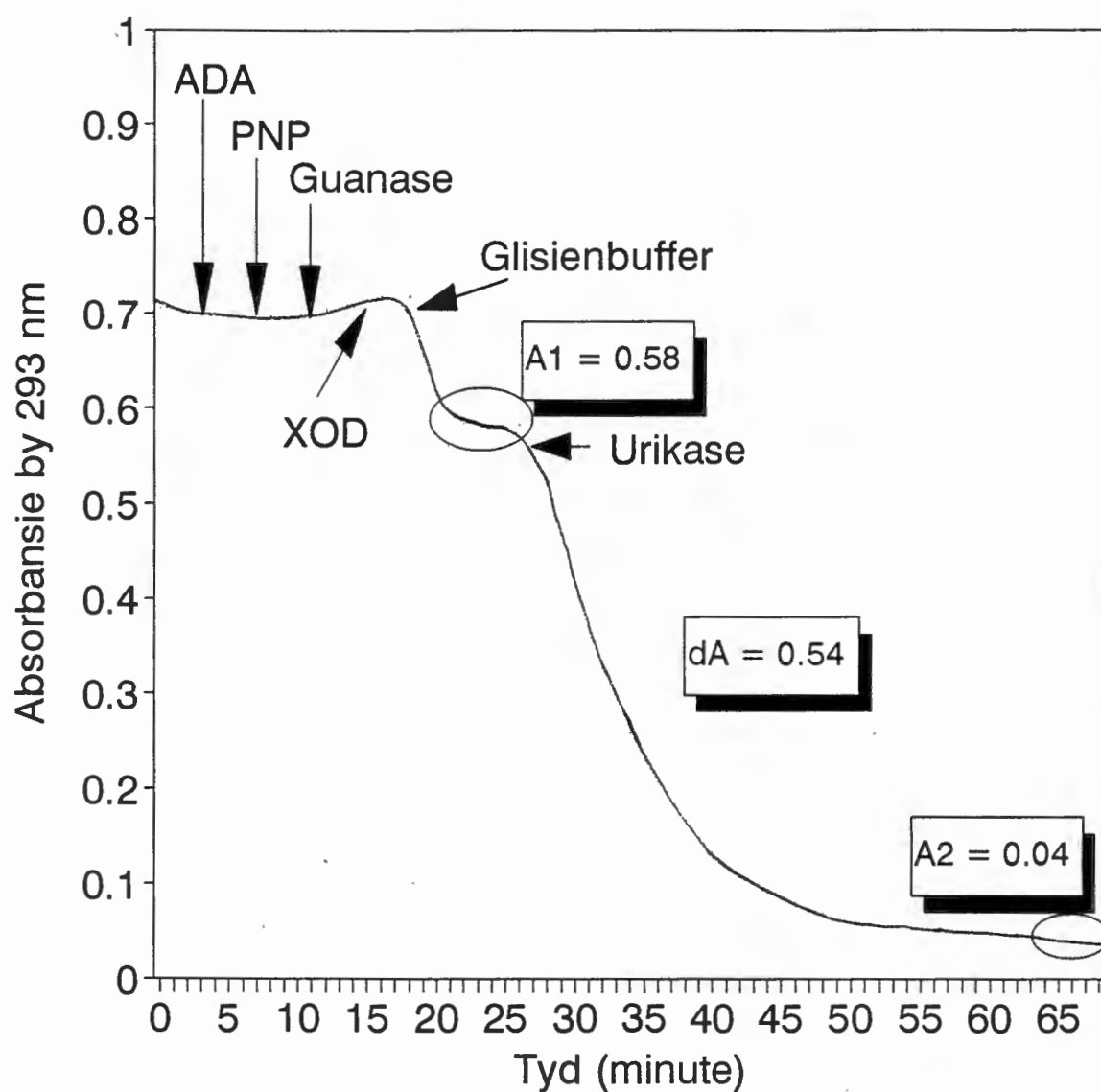
Figuur A.4: Die bepaling van die konsentrasie van xantien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg.



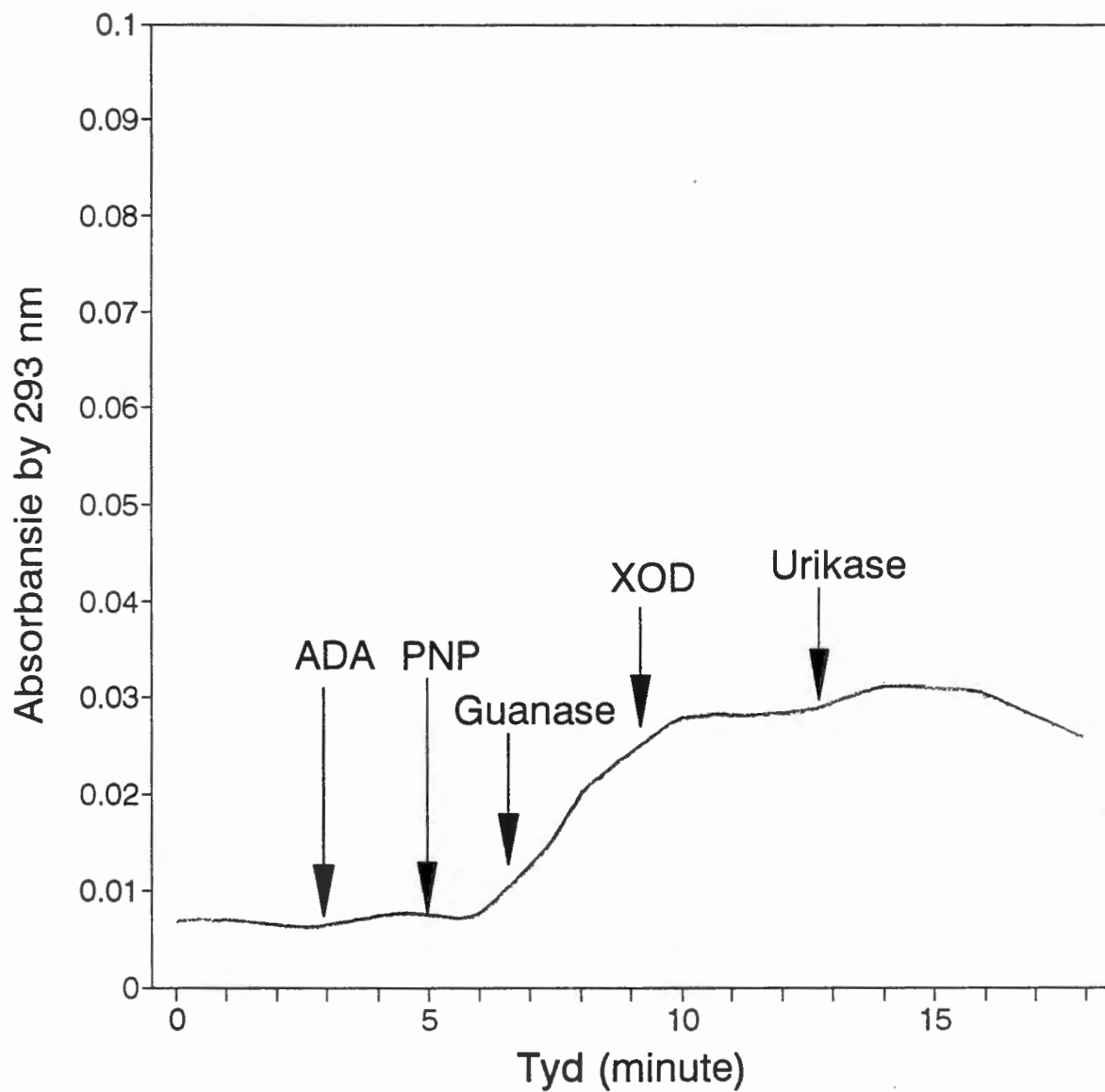
Figuur A.5: Die bepaling van die konsentrasie van guanosien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg.



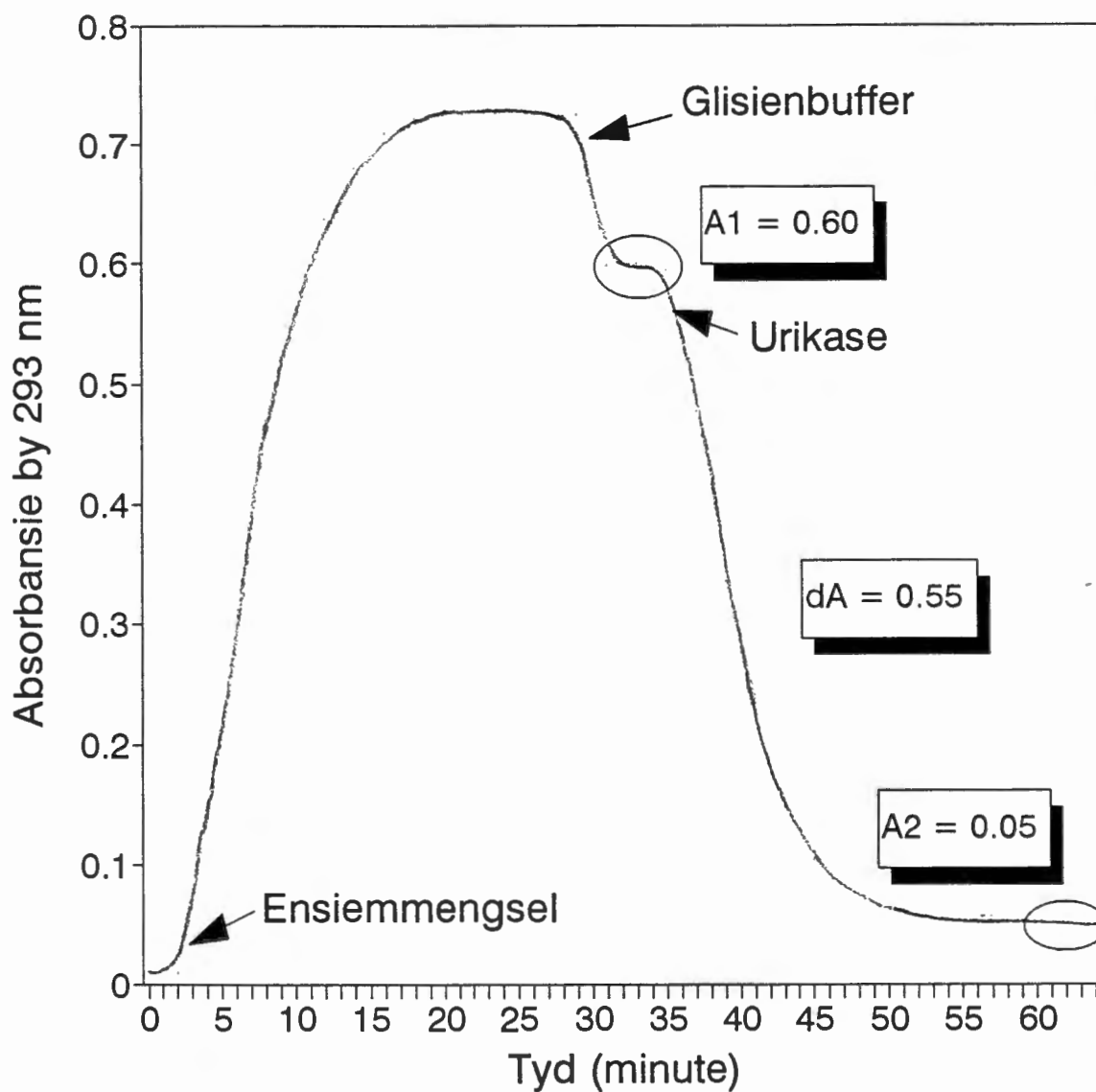
Figuur A.6: Die bepaling van die konsentrasie van guanien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg.



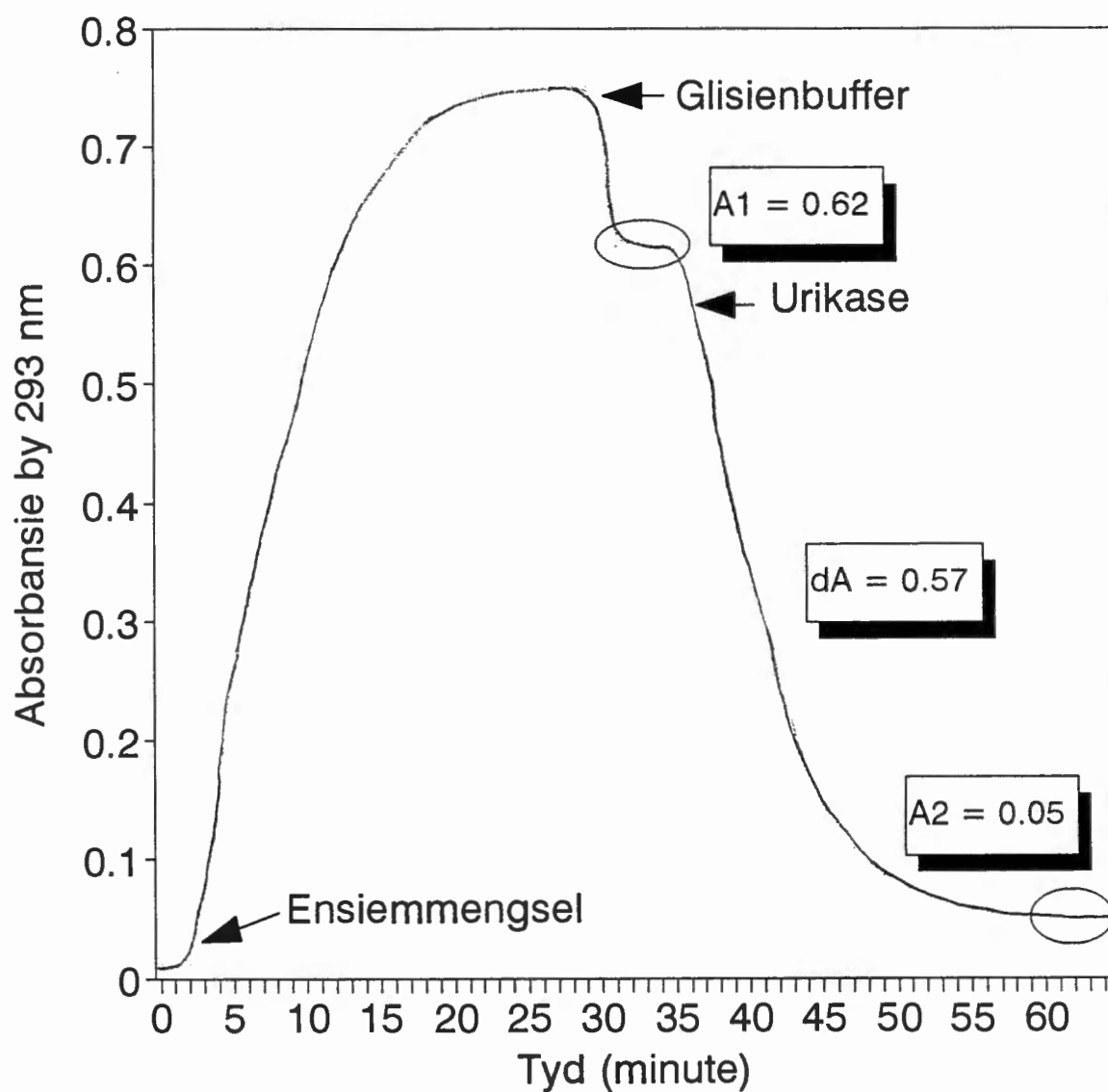
Figuur A.7: Die bepaling van die konsentrasie van urien-suur. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg.



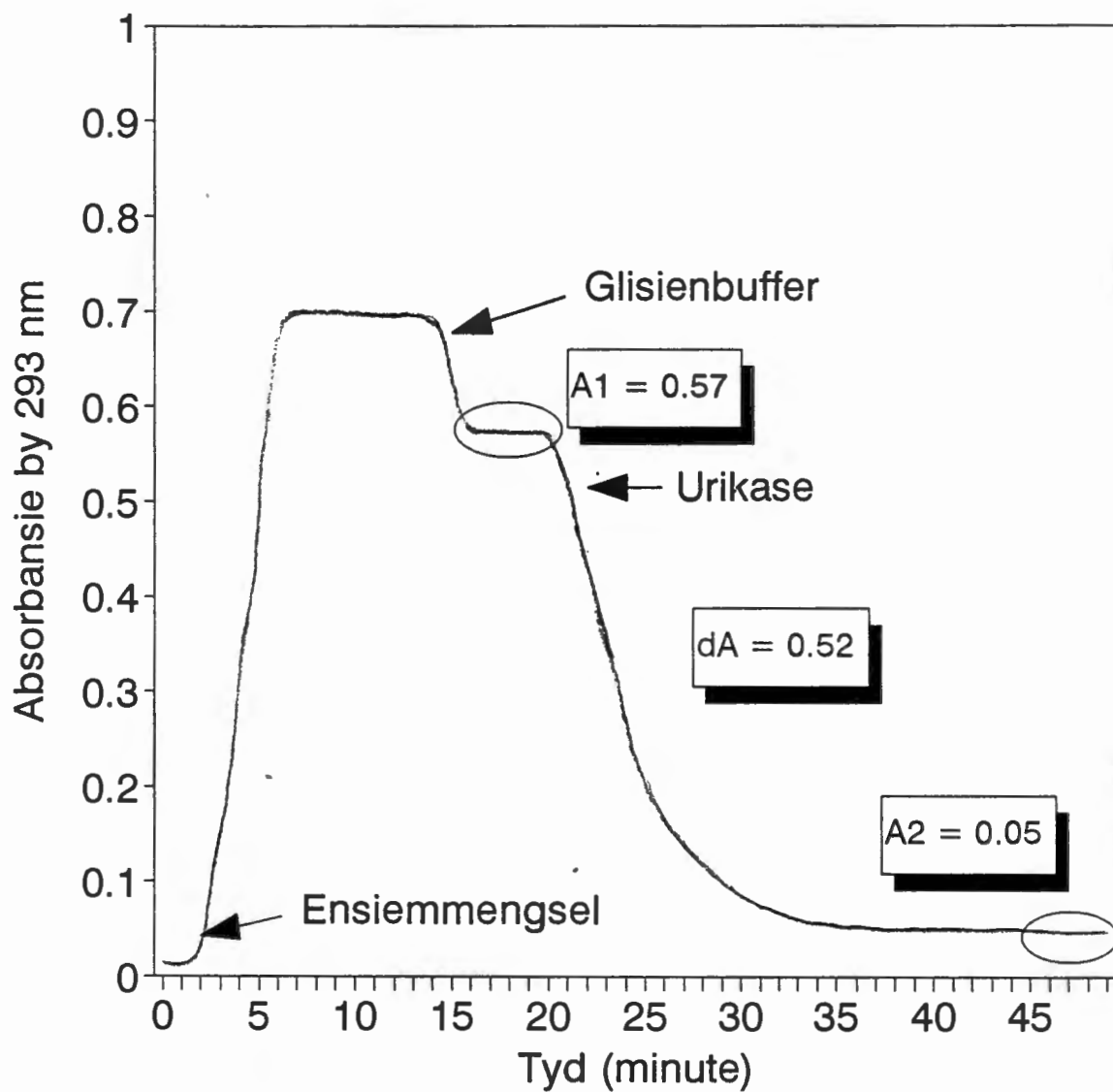
Figuur A.8: Die bepaling van die blanko. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is afsonderlik stapsgewys bygevoeg.



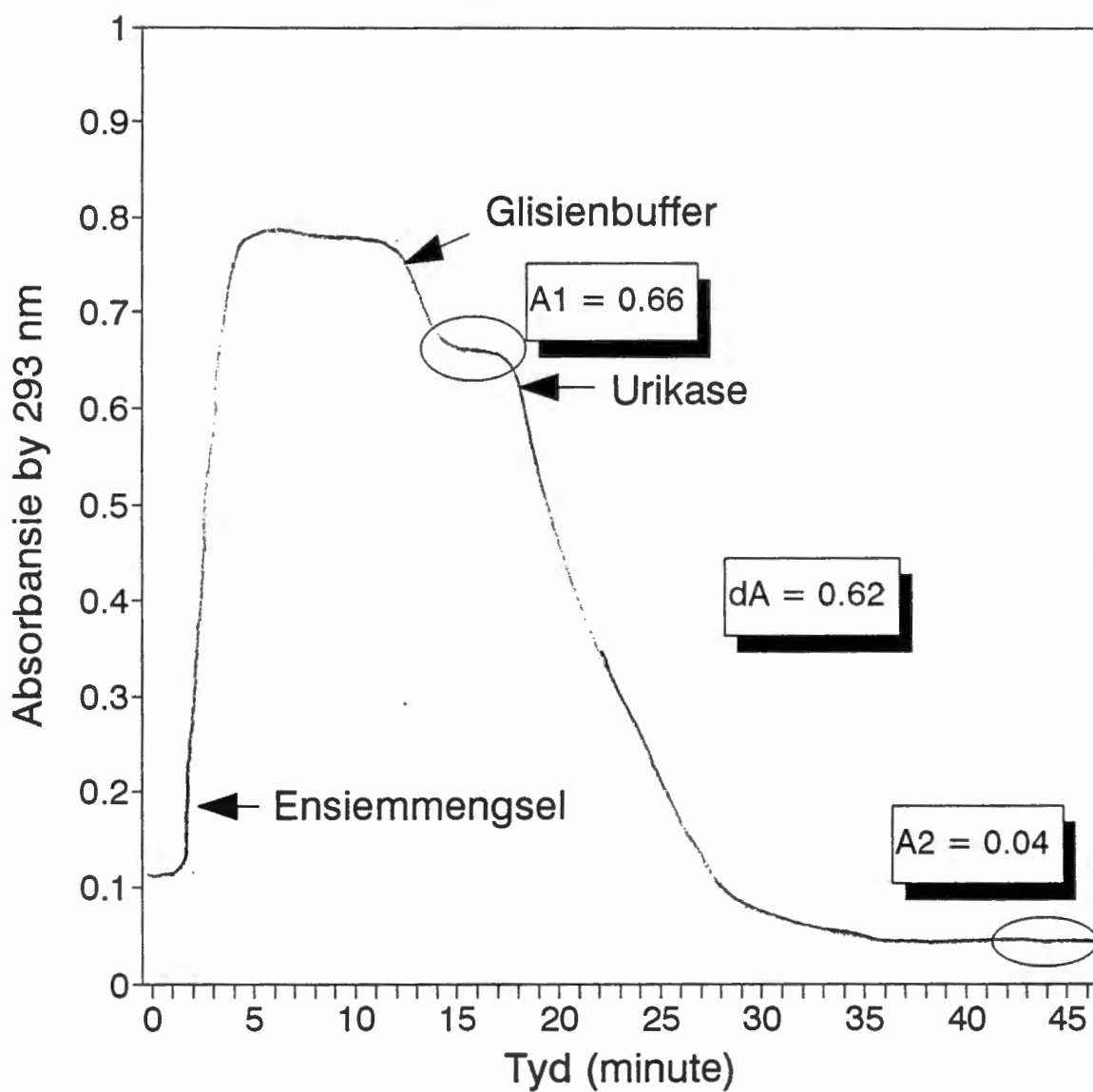
Figuur A.9: Die bepaling van die konsentrasie van adenosien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.



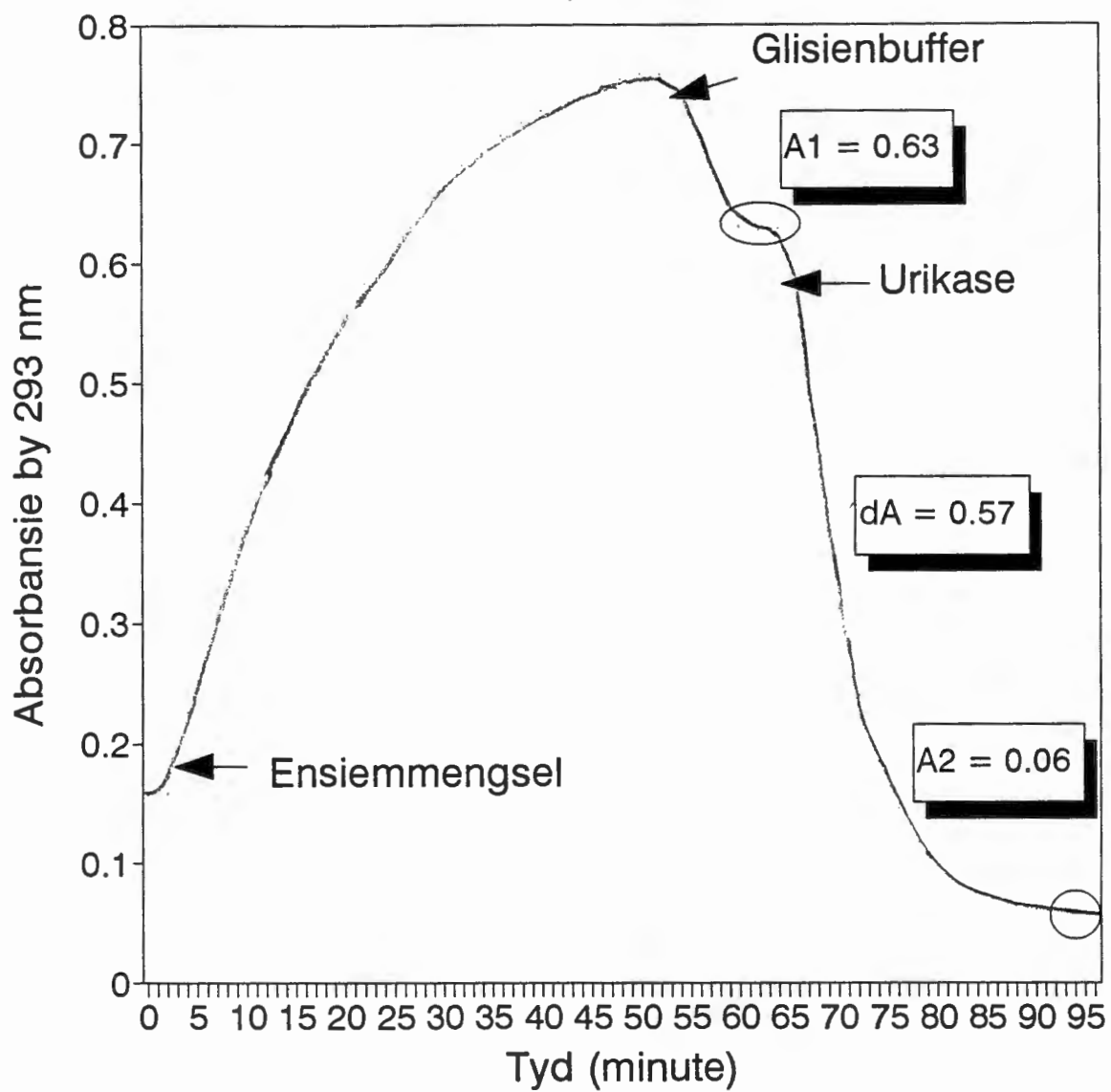
Figuur A.10: Die bepaling van die konsentrasie van inosien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.



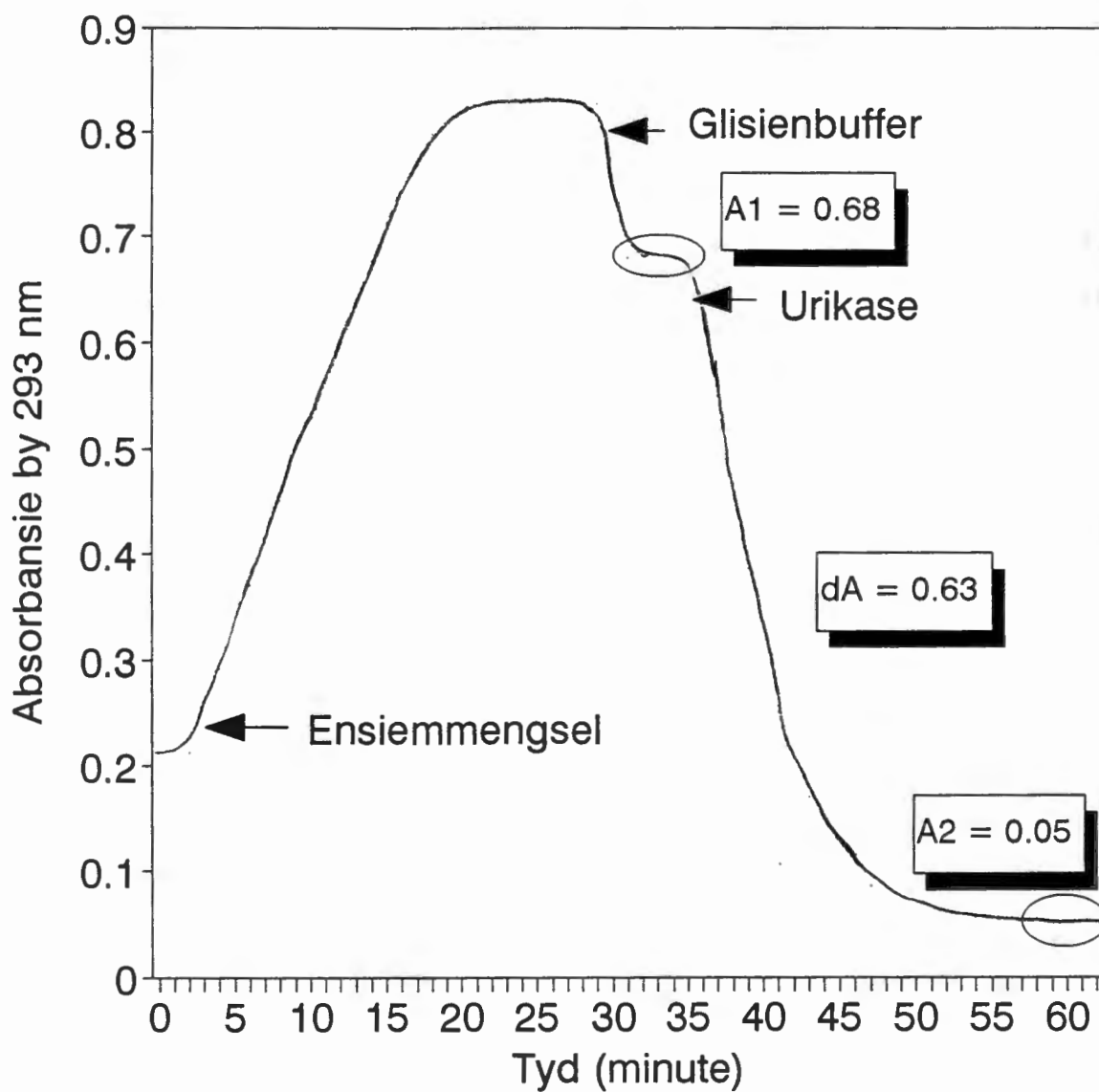
Figuur A.11: Die bepaling van die konsentrasie van hipoxantien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.



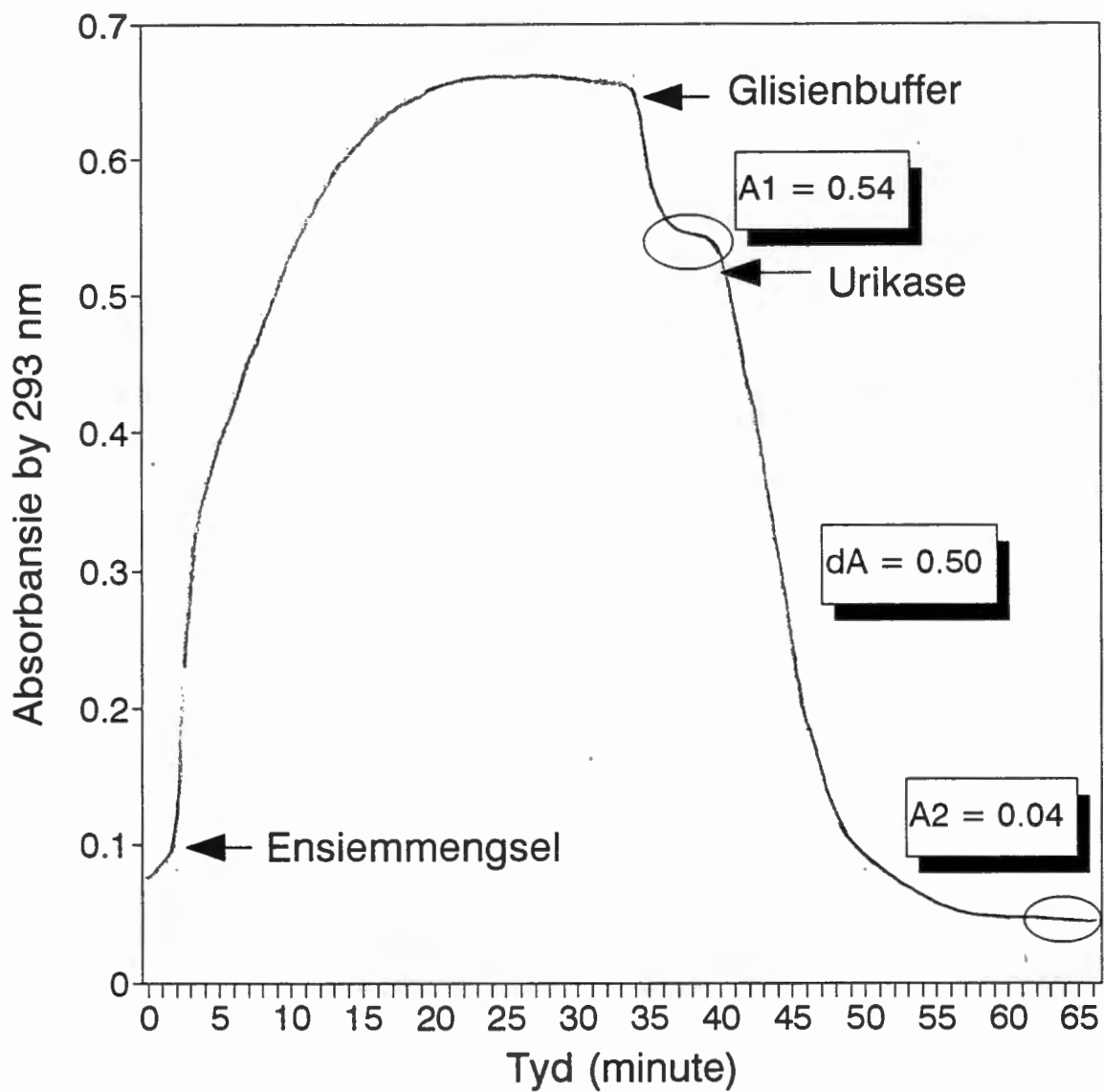
Figuur A.12: Die bepaling van die konsentrasie van xantien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.



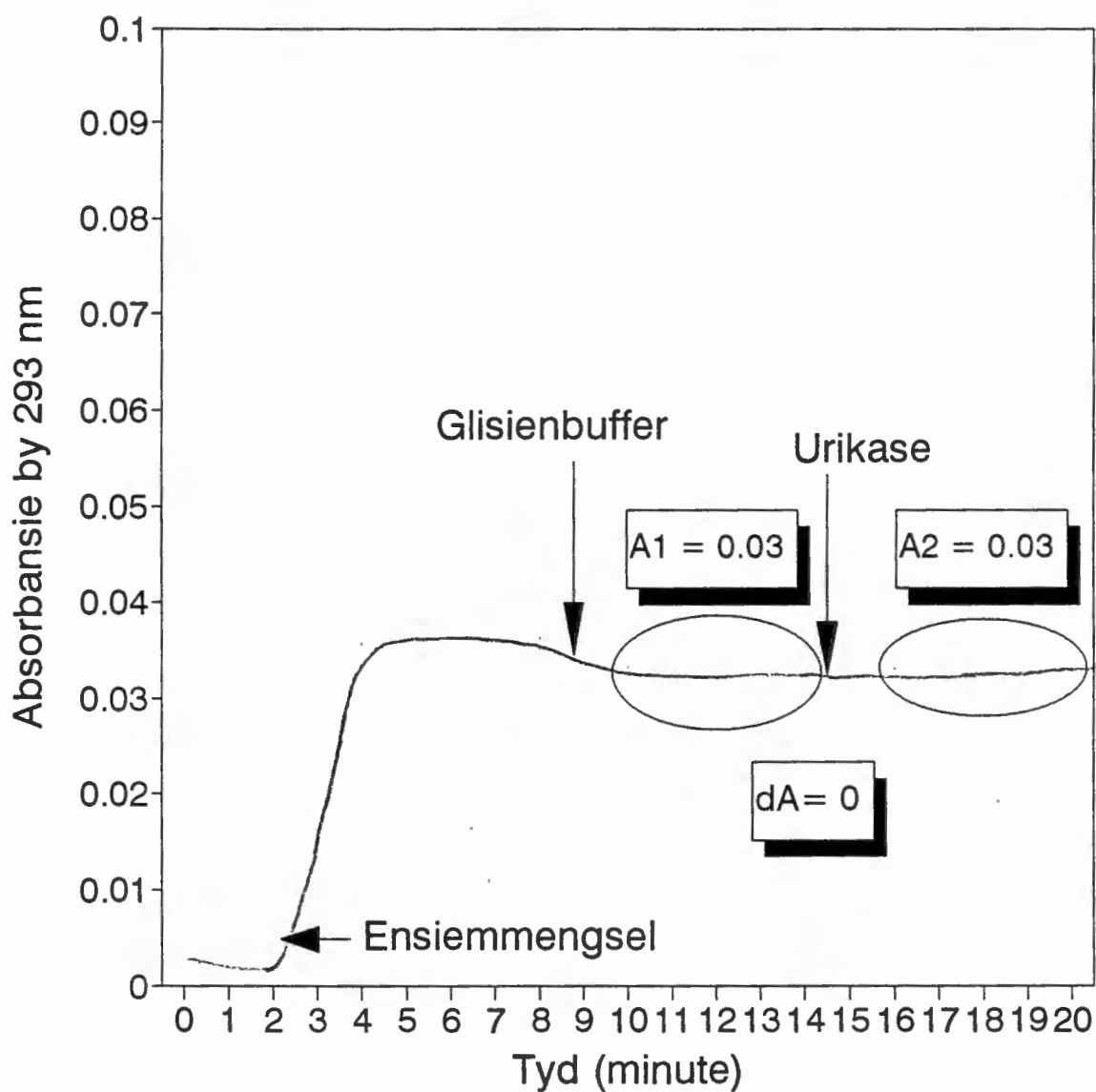
Figuur A.13: Die bepaling van die konsentrasie van guanosien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.



Figuur A.14: Die bepaling van die konsentrasie van guanien. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.



Figuur A.15: Die bepaling van die konsentrasie van die purienmengsel. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.



Figuur A.16: Die bepaling van die blanko. Die ensieme ADA, PNP, guanase en XOD is saam as 'n eenheid bygevoeg.

BYLAE B

DIE BEPALING VAN DIE KONSENTRASIES TOTALE PURIENE EN URIENSUUR IN URINE

B.1. INLEIDING

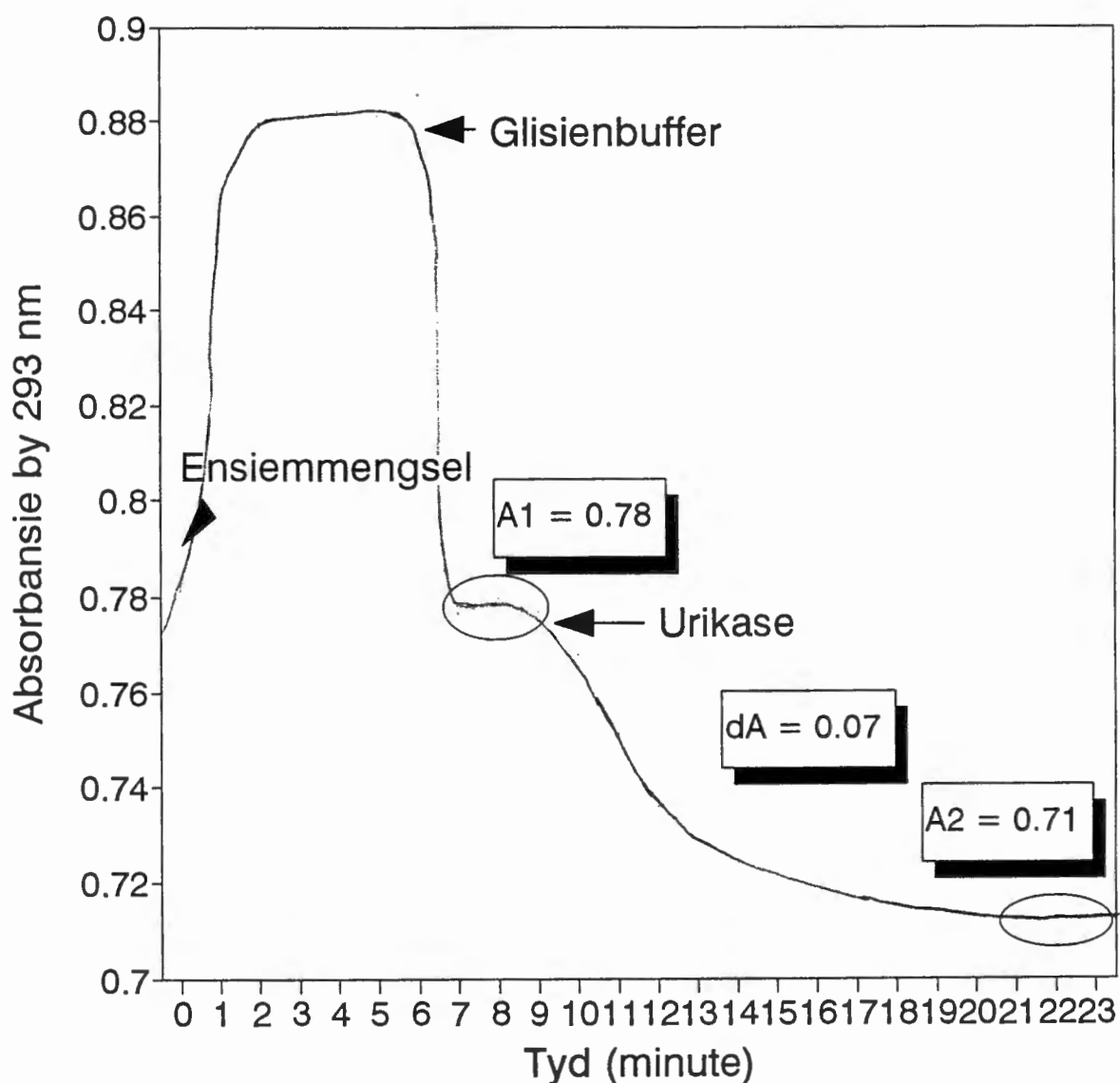
Die bepaling van die konsentrasies totale puriene en uriensuur in urine word in Hoofstuk 4 bespreek. In hierdie bylae word slegs die resultate van enkele urienmonsters van kontrolepersone en persone met relevante metaboliese defekte aangetoon.

B.2. DIE BEPALING VAN DIE TOTALE PURIENE IN URINE

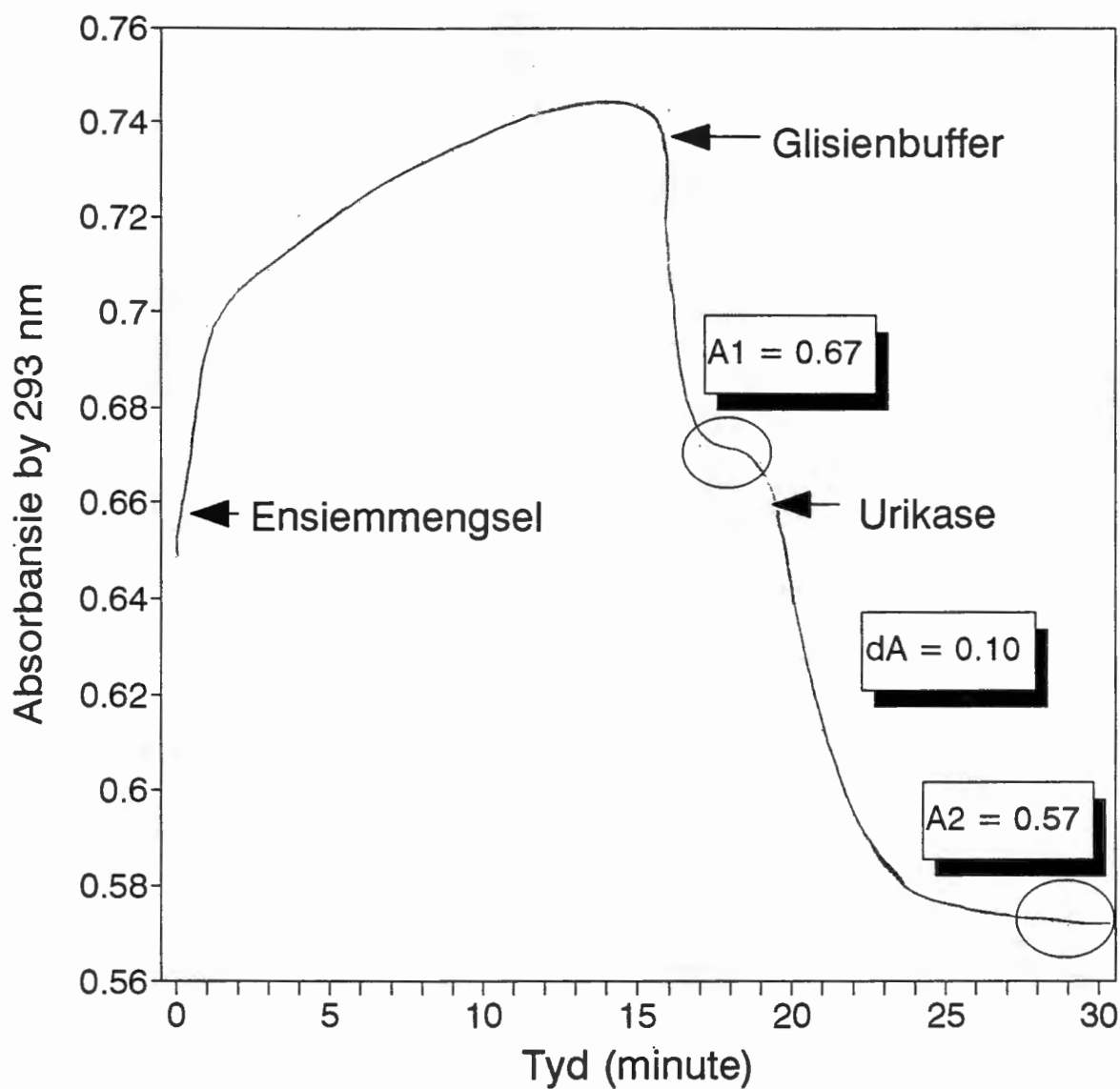
Die bepaling van die totale puriene in urine word in Hoofstuk 4, Afdeling 4.2.3, bespreek. In Figure B.1, B.2, B.3 en B.4 word onderskeidelik die verloop van die reaksies (absorbansie by 293 nm teenoor tyd in minute) vir die bepaling van die totale puriene in urienmonsters D, 1a, 6e en 7c aangedui.

B.3. DIE BEPALING VAN URIENSUUR IN URINE

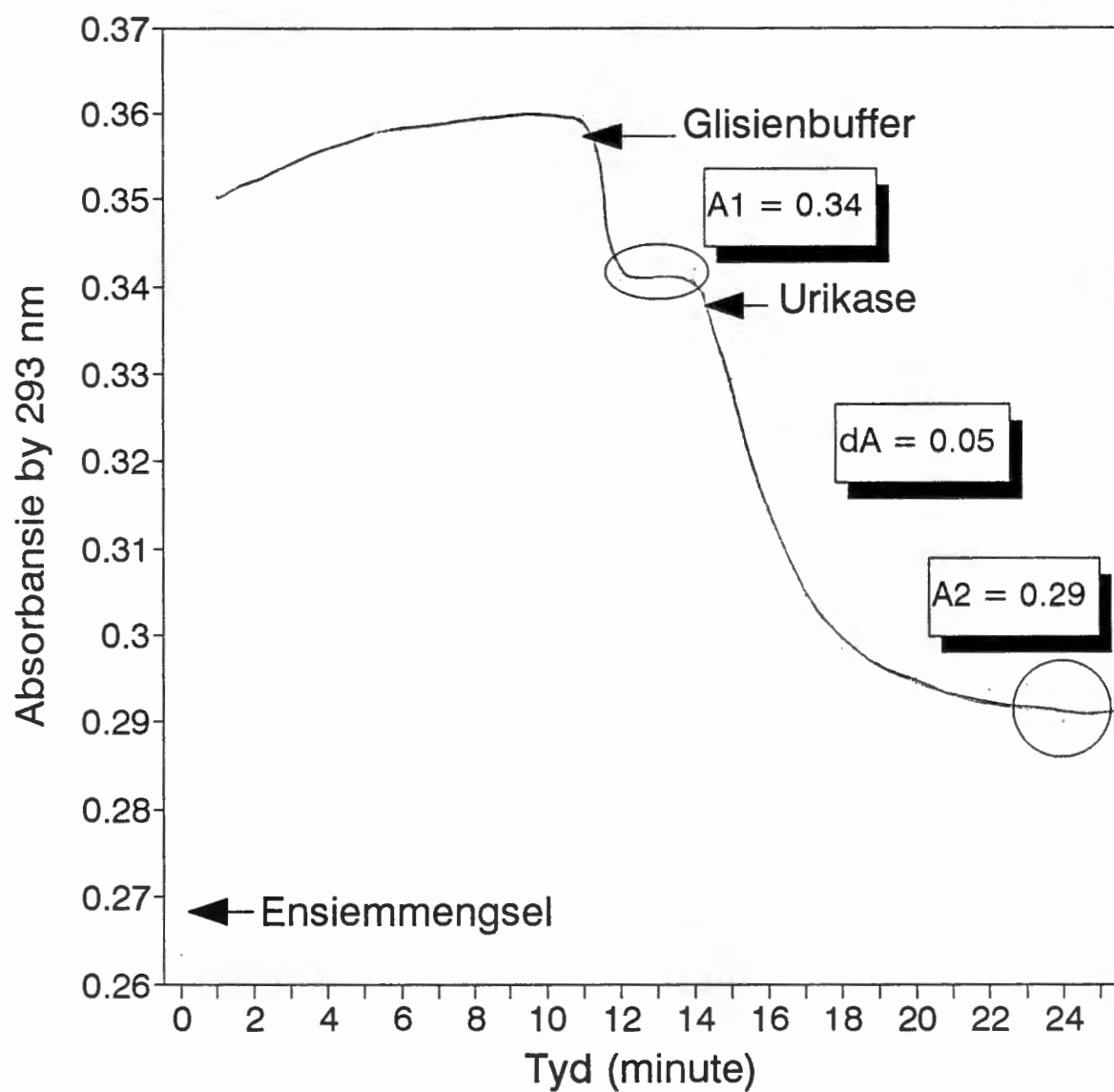
Die bepaling van die uriensuur in urine word in Hoofstuk 4, Afdeling 4.2.4, bespreek. In Figure B.5 en B.6 word onderskeidelik die verloop van die reaksies (absorbansie by 293 nm teenoor tyd in minute) vir die bepaling van die uriensuur in urienmonsters D en 2e aangedui.



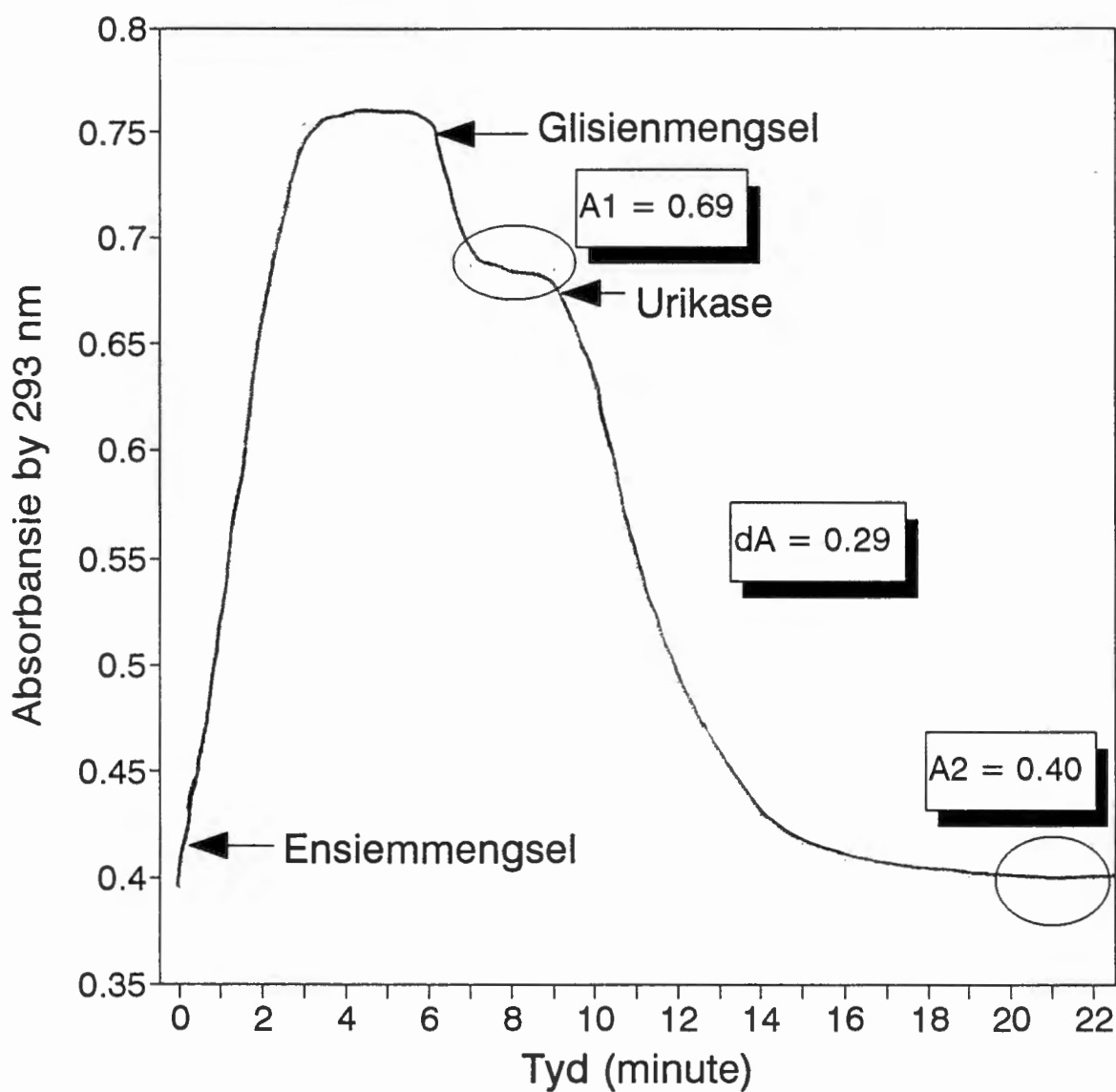
Figuur B.1: Die bepaling van die totale puriene in urien-monster D. Die totale verdunningsfaktor wat gebruik is, is vyf-en-twintig (sien Afdeling 4.2.3). Die plekke waar die ensieme en glisienbuffers bygevoeg is en absorban-sielesings geneem is, word aangedui, asook die waardes van die absorban-sielesings en die berekende verandering in absorbansie.



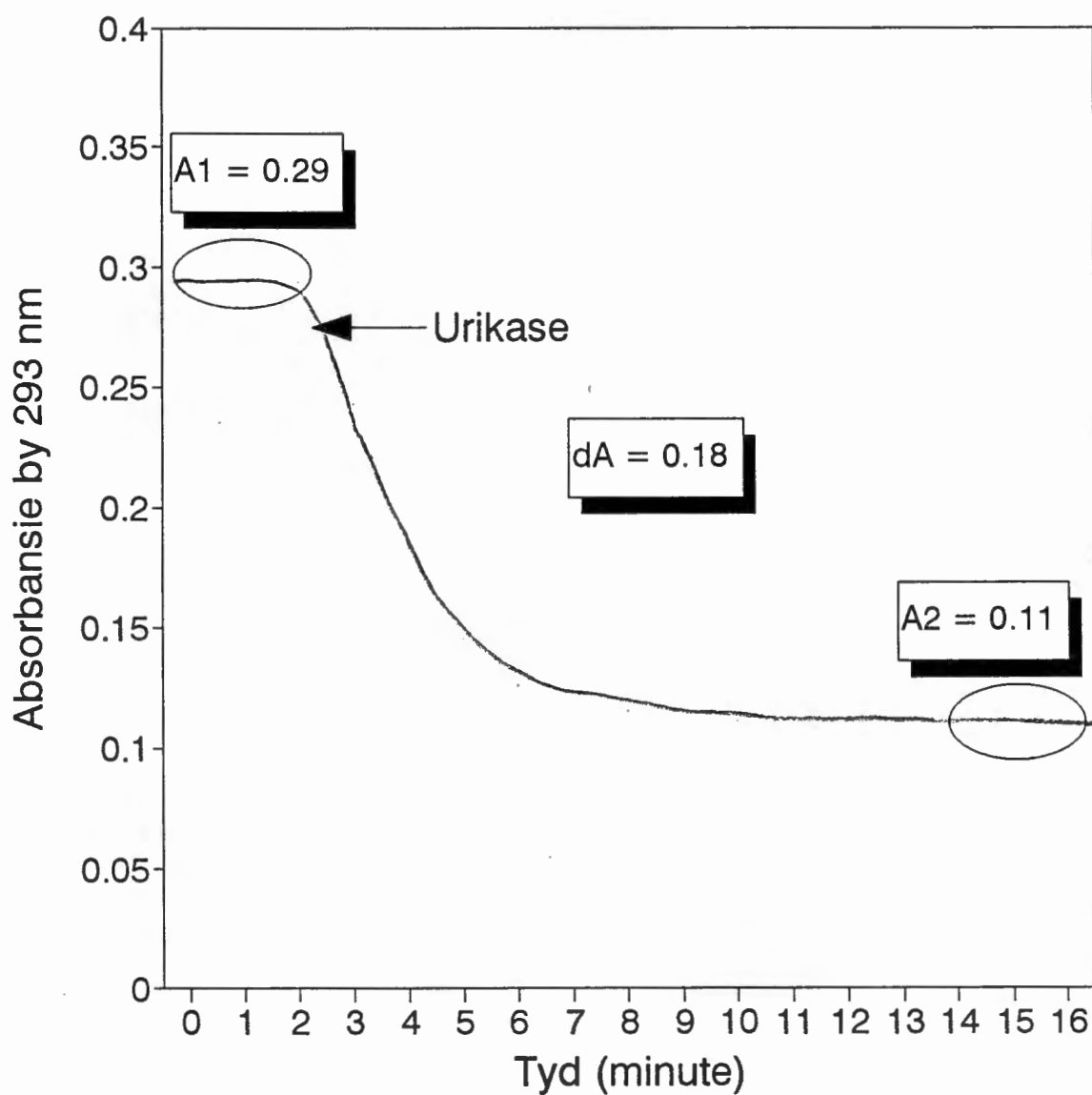
Figuur B.2: Die bepaling van die totale puriene in urienmonster 1a. Die totale verdunningsfaktor wat gebruik is, is veertig (sien Afdeling 4.2.3).



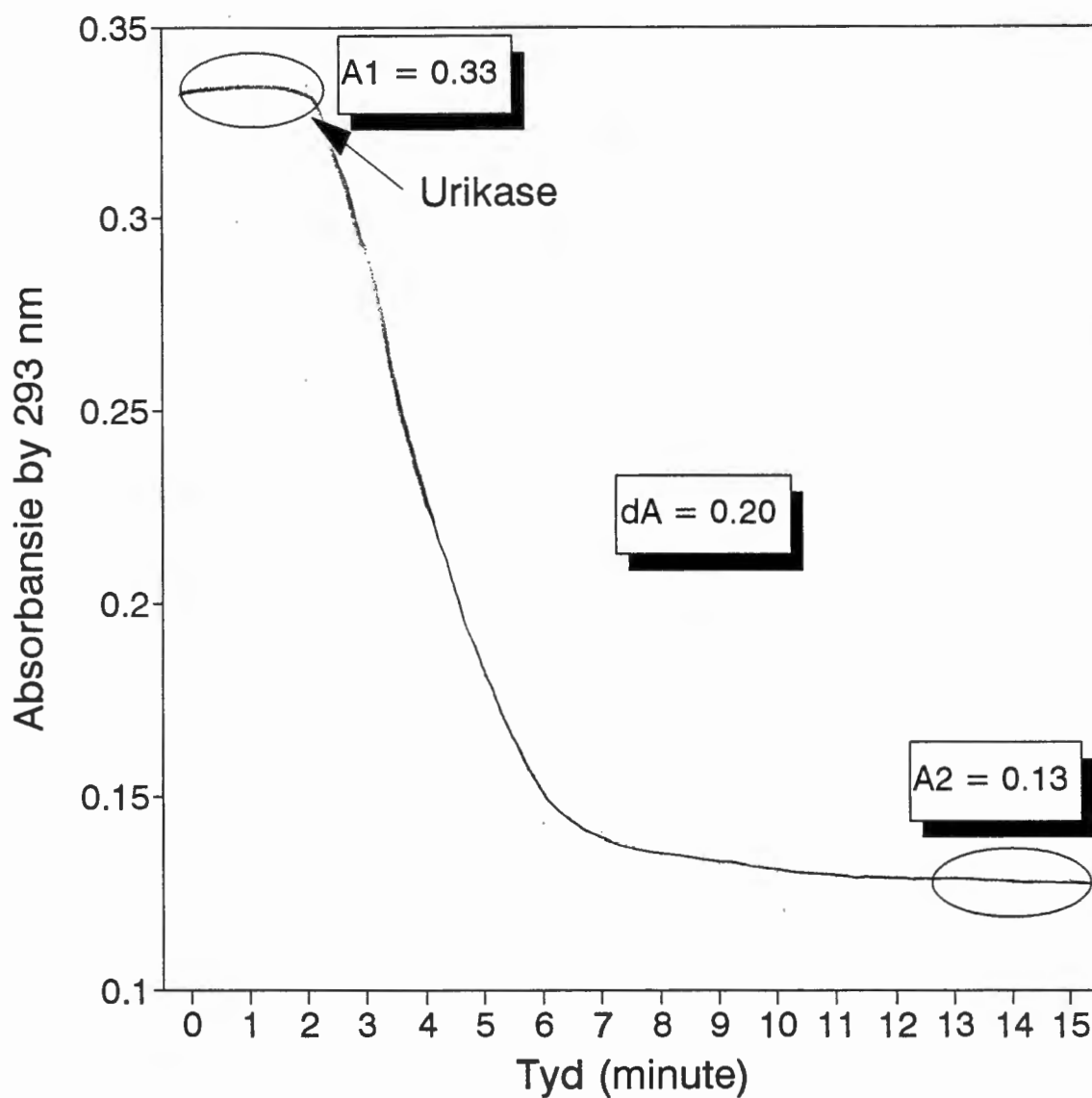
Figuur B.3: Die bepaling van die totale puriene in urienmonster 6e. Die totale verdunningsfaktor wat gebruik is, is vyf-en-twintig (sien Afdeling 4.2.3).



Figuur B.4: Die bepaling van die totale puriene in urien-monster 7c. Die totale verdunningsfaktor wat gebruik is, is veertig (sien Afdeling 4.2.3).



Figuur B.5: Die bepaling van uriensuur in die urienmonster D. Die totale verdunningsfaktor wat gebruik is, is twee honderd (sien Afdeling 4.2.4).



Figuur B.6: Die bepaling van uriensuur in die urienmonster 2e. Die totale verdunningsfaktor wat gebruik is, is een honderd (sien Afdeling 4.2.4).

AFKORTINGS

A	: Absorbansie
ADA	: Adenosindeaminase
ADP	: Adosindifosfaat
AICAR	: 5'-Fosforibosiel-5-amino-4-imidasoolkarbok-samied
AIR	: 5'-Fosforibosiel-5-amino-imidasool
AMP	: Adosienmonofosfaat
Amido-PRT	: Amido-fosforibosieltransferase
APRT	: Adenienfosforibosieltransferase
ATP	: Adosientrifosfaat
A _{urikase}	: Die mate waarin urikase lig absorbeer
δA	: Verandering in absorbansie
δA_{293}	: Verandering in absorbansie by 293 nm
d	: Sellengte
2,8-DHA	: 2,8-Dihidro-adenien
DNA	: Deoksiribonukleïensuur
c	: Konsentrasie in die kuvet
C	: Eindkonsentrasie
ϵ	: Ekstinksiekoëffisiënt
f	: Verdunningsfaktor
FAD	: Flavienadeniendinukleotied
FGAM	: 5'-Fosforibosiel- α -N-formiel-glisien-amidien
FGAR	: 5'-Fosforibosiel- α -N-formiel-glisien-amied
GAR	: 5'-Fosforibosiel-glisienamied
GC	: Gaschromatografie
GDP	: Guanosiendifosfaat
GMP	: Guanosienmonofosfaat
GTP	: Guanosientrifosfaat
H ₂ O ₂	: Waterstofperoksied
HGPRT	: Hipoxantien-guanien-fosforibosieltransferase
HPLC	: Hoëdruk vloeistofchromatografie
IMP	: Inosienmonofosfaat
K ⁺⁺	: Kalium
Mg ⁺⁺	: Magnesium
NAD	: Nikotinamiedadenosien-dinukleotied
NaOH	: Natriumhidroksied
PEP	: Fosfoenolpiruvaat

PNP : Puriennukleosiedfosforilase
 PR : Fosforibosiel
 PRPP : 5-Fosfo-D-ribosiel- α -1-pirofosfaat
 RNA : Ribonukleïensuur
 sAMP : Adenilosuksinaat
 SCID : ernstige saamgestelde immunodefek
 Suksino-AICAR : 5'-Fosforibosiel-5-amino-4-imidasool-
 suksinokarboksamied
 THFA : N⁶,N¹⁰-meteniel-tetrahydrofoliensuur
 XMP : Xantosien-5'-monofosfaat
 XOD : Xantienoksidase

BIBLIOGRAFIE

BAKKER, H.D., ABELING, N.G.G.M., TEN HOUTON, R. VAN DEN BLIJ, J.F., OVERWEG-PLANDSOEN, W.C.G., WANDERS, R.J.A. & VAN GENNIP, A.H. 1993. Molybdenum cofactor deficiency can mimic postanoxic encephalopathy. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(5):900-901.

BECKER, M.A. & ROESSLER, B.J. 1995. Hyperuricemia and Gout. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II. New York: McGraw-Hill. p. 1655-1678)

CHU, T.S., LIU, Y.l. & YEN, T.S. 1993. A Chinese case of hereditary xanthinuria. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(5):899.

CODDINGTON, A. 1965. Guanosine. (In Bergmeyer, H-U., ed. Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press. p. 505-507)

CODDINGTON, A. 1965. Inosine. (In Bergmeyer, H-U., ed. Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press. p. 502-504)

DRY, J. 1994. Methods for the detection and diagnosis of inborn errors in the purine and pyrimidine metabolism. Potchefstroom: PU vir CHE. (Dissertation - M.Sc.) p. 177

FUJITAKA, M., SAKURA, N., UEDA, K., KONISHI, H., YOSHIDA, S. & YAMASAKI, T. 1991. Case report: Attempt at treatment with tetrahydrobiopterin in combined deficiency of xanthine oxidase and sulphite oxidase. *Journal of inherited metabolic disease*, 14: 843-844.

GIBLETT, E.R. 1985. ADA and PNP deficiencies: How it all began. (In Tritsch, G.L., ed. Annals of the New York Academy of Sciences volume 451: Adenosine deaminase in disorders of purine metabolism and in immune deficiency. New York. p.1-8)

HERSHFIELD, M.S. & MITCHELL, B.S. 1995. Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II. New York: McGraw-Hill. p. 1725-1749)

HOLMES, E.W. & WYNGAARDEN, J.B. 1989. Hereditary xanthinuria. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic basis of inherited disease: Part 1. New York: McGraw-Hill. p. 1085-1093)

JENSEN, M.H. 1985. Total amount of purines and purine nucleosides. (In Bergmeyer, H-U. Methods of enzymatic analyses, 3rd ed., volume VII: Metabolites 2: Tri- and Dicarboxylic acids, purines, pyrimidines and derivatives, coenzymes, inorganic compounds. Weinheim: VCH Publishers p. 101-110)

JOHNSON, J.L. & WADMAN, S.K. 1989. Molybdenum cofactor deficiency. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic basis of inherited disease: Part 1. New York: McGraw-Hill. p. 1463-1475)

JOHNSON, J.L. & WADMAN, S.K. 1995. Molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II. New York: McGraw-Hill. p. 2271-2282)

JØRGENSEN, S. 1965. Hypoxanthine and xanthine. (In Bergmeyer, H-U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press. p. 495-499)

KALCKAR, H.M. 1947. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. *Journal of biological chemistry*, 167:429-444

KLINE, P.C. & SCHRAMM, V.L. 1992. Purine nucleoside phosphorylase. Inosine hydrolysis, tight binding of the hypoxanthine intermediate, and third-site reactivity, *Biochemistry*, 31:5964-5973

KREDICH, N.M. & HERSHFELD, M.S. 1989. Immunodeficiency diseases caused by adenosine deaminase deficiency and purine nucleoside phosphorylase deficiency. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. *The metabolic basis of inherited disease: Part 1*. New York: McGraw-Hill. p. 1045-1067)

MATEOS, F.A. & PUIG, J.G. 1994. Purine metabolism in Lesch-Nyhan syndrome versus Kelley-Seegmiller syndrome, *Journal of inherited metabolic disease*, 17(1):138-142

MCCARTY, D.J. 1994. Gout without hyperuricemia. *Journal of the American Medical association*, 271(4):302-303

MOHAMEDALI, K.A., GUICHERIT, O.M., KELLEMS, R.E. & RUDOLPH, F.B. 1993. The highest levels of purine catabolic enzymes in mice are present in the proximal small intestine. *Journal of biological chemistry*, 268 (31):23728-23733

MÖLLERING, H. & BERGMAYER, H-U. 1965. Adenosine. (In Bergmeyer, H-U, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press. p. 491-494)

NEWCOMBE, D.S. 1975. Inherited biochemical disorders and uric acid metabolism. Aylesbury: HM+M Publishers. 250 p.

PALELLA, T.D. & FOX, I.H. 1989. Hyperuricemia and gout. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic basis of inherited disease: Part 1. New York: McGraw-Hill. p. 965-997)

PALMER, T. 1991. Understanding enzymes, 3rd ed.. New York: Ellis Horwood. 399p.

PRAETORIUS, E. 1965. Uric acid. (In Bergmeyer, H-U, ed. Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press. p. 500-501)

ROESSLER, B.L., NOSAL, J.M., SMITH, P.R., HEIDLER, S.A., PALELLA, T.D., SWITZER, R.L. & BECKER, M.A. 1993. Human X-linked phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity is associated with distinct point mutations in the PRPS1 gene, *Journal of biological chemistry*, 268(35):26476-26481

ROSSITER, B.J.F. & CASKEY, C.T. 1995. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency: Lesch-Nyhan syndrome and gout. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II. New York: McGraw-Hill,. p. 1679-1697)

SABINA, R.L. & HOLMES, E.W. 1995. Myoadenylate deaminase deficiency. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II. New York: McGraw-Hill. p. 1769-1777)

SABINA, R.L., SWAIN, J.L. & HOLMES, E.W. 1989. Myo-adenylate deaminase deficiency. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic basis of inherited disease: Part 1. New York: McGraw-Hill. p. 1077-1083)

SIMMONDS, H.A., REITER, S. & NISHINO, T. 1995b. Hereditary xanthinuria. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II. New York: McGraw-Hill. p.1781-1793)

SIMMONDS, H.A., SAHOTA, A.S. & VAN ACKER, K.J. 1989. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency and 2,8-dihydroxy-adenine lithiasis. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic basis of inherited disease: Part 1. New York: McGraw-Hill. p.1029-1041)

SIMMONDS, H.A., SAHOTA, A.S. & VAN ACKER, K.J. 1995a. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency and 2,8-dihydroxy-adenine lithiasis. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic and molecular bases of inherited disease, Volume II. New York: McGraw-Hill. p. 1701-1720)

STECHER, R.M. 1957. Heredity in joint diseases: The genetics of Heberden's nodes, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, rheumatic fever, gout and osteoarthritis of the hip. Switzerland: J.R. Geigy S.A. 71 p.

STOUT, J.T. & CASKEY, C.T. 1989. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase deficiency: The Lesch-Nyhan syndrome and gouty arthritis. (In Schriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., ed. The metabolic basis of inherited disease: Part 1. New York: McGraw-Hill. p.1007-1023)

VAN DEN BERGHE, G., BONTEMPS, F., VINCENT, M.F. & VAN DEN BERGH, F. 1992. The purine nucleotide cycle and its molecular defects, *Progress in neurology*, 39(5): 547-561, Nov

VAN GENNIP, A.H. 1981. Screening for disorders of purine and pyrimidine metabolism: A chromatic approach. Utrecht: Rijksuniversiteit (Thesis - Ph.D.). p.19-70.

VAN GENNIP, A.H., ABELING, N.G.G.M., STROOMER, A.E.M., OVERMARS, H., BAKKER, H.D. 1994. The detection of molybdenum cofactor deficiency: Clinical symptomatology and urinary metabolite profile, *Journal of inherited metabolic disease*, 17(1): 142-145 Amsterdam.