

**DIE BIOCHEMIESE BASIS VAN DIE GEBRUIK
VAN OROTIENSUUR IN DIE DIAGNOSE
VAN AANGEBORE METABOLIESE DEFEKTE**

ODETTE HEYNEKE Hons. B.Sc.

Verhandeling voorgelê vir die graad Magister Scientiae in Biochemie aan
die Noord-Wes Universiteit, Potchefstroom Kampus

Studieleier: Prof. L.J. Mienie

Medestudieleier: Mnr. E. Erasmus

Ingehandig: 25 Januarie 2005

Potchefstroom

BEDANKINGS

Graag wil ek die volgende persone bedank vir hul onmisbare rol wat hulle gespeel het tydens die afloop van die studie:

My Hemelse Vader vir die talent en vermoë wat Hy my gegee het om so ver met my studies te vorder. Dankie Here vir die karakter wat U in my gebou het deur die proses asook U liefde en voorsiening.

Prof. Mienie, my studieleier, vir sy bystand, tyd en leiding waarsonder die studie nie moontlik sou wees nie.

My ouers. Baie dankie vir julle liefde, bemoediging, ondersteuning en al die opofferings wat julle gemaak het sodat ek my doelwitte kon bereik. Ek dra hierdie verhandeling aan julle op. Julle was my inspirasie en motivering.

Nellie Scheepers, Brenda Klopper, Lynette Engelbrecht en Ansie Mienie vir al die hulp, advies en ondersteuning wat ek van hulle ontvang het. Ek is baie dankbaar daarvoor.

My man, Jake. Jy was my steunpilaar.

Die Mediese Navorsingsraad vir hul finansiële ondersteuning.

INHOUDSOPGAWE

LYS VAN FIGURE	vi
LYS VAN TABELLE	x
LYS VAN AFKORTINGS	xi
ABSTRACT	xliii
OPSOMMING	xv
<i>Hoofstuk 1 Inleiding</i>	1
1.1 AGTERGROND	1
1.2 VOORGESTELDE BENADERING VIR DIE SELEKSIE VAN PASIËNTE MET MOONTLIKE METABOLIESE DEFEKTE	3
1.3 SELEKSIE VAN EENVOUDIGE SIFTINGSTOETS WAT GEEVALUEER SAL WORD IN DIE STUDIE.	4
<i>Hoofstuk 2 Literatuurstudie</i>	7
2.1 INLEIDING	7
2.2 METABOLISME VAN OROTIENSUUR	9
2.2.1 De Novo biosintese van pirimidiene	10
<i>2.2.1.1 Inleiding</i>	10
<i>2.2.1.2 Eerste, tweede en derde reaksie stappe: Karbamoïelfosfaatsintase, Aspartienuurtranskarbamilase en Dihidro-orotase</i>	10
<i>2.2.1.3 Vierde reaksie stap: Dihidro-orotienuurdehidrogenase</i>	13
<i>2.2.1.4 Vyfde en sesde reaksie stappe: Orotienuurfosforibosieltransferase en Orotidien-5-monofosfaatdekarboksilase</i>	14

2.2.2 Interomskakeling	15
2.2.3 Pirimidienherwinning	16
2.2.4 Pirimidienafbraak/degradasie	16
2.2.5 Regulering van die primidien metabolisme	17
2.3 SKAKEL TUSSEN NH₃ EN OROTIENSUUR	18
2.4 DEFEKTE WAT AANLEIDING GEE TOT HIPERAMMONEMIE	20
2.4.1 Ureumsiklus defekte: karbamoïelfosfaatsintetase I (CPS I)defek, ornitientranskarnilase (OTC) defek, argininosuksiensuursintase defek (sitrullinemia, CTR), argininosuksiensuurliase defek (argininosuksiensuururie, ASA), arginase defek (arginemia, ARG) en N-asetielglutamiensuursintase (NAGS) defek	20
2.4.2 Transport defekte van dibasiese aminosure: hiperdibasiese aminosuururie (lisien-proteïen intoleransie, LPI) en hiperornitinemie-hiperammonemie-homositrullienurie (HHH) sindroom	21
2.4.3 Organiese-suururieë: (bv. propioonsuururie, metielmaloonsuururie, isovaleriaansuururie)	23
2.4.4 Pirovaatkarboksilase defekte	24
2.4.5 Defekte in die β-oksidasie van vetsure en ander defekte wat energie produksie beperk: (bv. medium-ketting asiel-KoA dehidrogenase defek)	24
2.4.6 Defekte wat tot lewerskade en gevolglik tot verhoogde ammoniak aanleiding gee	25
2.4.7 Verhoging van orotiensuur as gevolg van ander metaboliese defekte wat met hiperammonemie gepaard gaan	26
2.5 METODES VIR DIE BEPALING VAN OROTIENSUUR	26
2.5.1 Inleiding	26
2.5.2 Analitiese metodes vir die bepaling van orotiensuur	27

<i>Hoofstuk 3 Materiale en Metodes</i>	29
3.1 KOLOMETRIESE BEPALING VAN OROTIENSUUR IN URIENE	29
3.1.1 Inleiding	29
3.1.2 Instrumentasie, materiale en reagense	29
3.1.3 Metode 1 (Rogers en Porter, 1968:423-428)	30
3.1.4 Metode 2 (Duran, 1985)	30
3.2 ORGANIESE-SUURANALISE	31
3.3 MONOSAKKARIEDANALISES	31
3.4 OLIGOSAKKARIEDANALISES	31
3.5 MUKOPOLISAKKARIEDANALISES	32
3.6 AMINOSUURANALISES	32
3.7 ASIELKARNITIENANALISES	32
3.8 BAIE-LANGKETING-VETSUURANALISES	32
3.9 HOË-DRUK VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE	33
3.9.1 Inleiding	33
3.9.2 Materiaal, reagense en instrumentasie	33
3.9.3 Voorbereiding van urienmonsters	34
3.10 KAPILLêRE ELEKTROFORESE	35
3.10.1 Reagense	35
3.10.2 Kapillêre elektroforese apparaat en kondisies	35
3.11 ALLOPURINOL BELADINGSTOETS	37
3.11.1 Inleiding	37
3.11.2 Metode	37

<i>Hoofstuk 4 Resultate</i>	39
4.1 INLEIDING	39
4.2 STANDARDISERING VAN DIE KOLOMETRIESE METODE VIR DIE BEPALING VAN OROTIENSUUR	39
4.3 STANDAARDISERING VAN PURIEN-PIRIMIDIEN-ANALISES	43
4.3.1 Standardisering van HPLC metode vir purien-pirimidienanalises	43
4.3.2 Kapillêre elektroforese analises van puriene en pirimidie	49
4.3.3 GC-MS analises van puriene en pirimidie	52
4.4 STANDAARDISERING VAN SIFTINGSMETODE	55
4.4.1 Benadering	55
4.4.2 Bepaling van normaalkonsentrasies en verspreiding.	56
<i>4.4.2.1 Invloed van medikasie op die uitskeiding van orotiensuur.</i>	58
<i>4.4.2.2 Ouderdomsverwantskap van urinêre orotiensuurkonsentrasies</i>	59
<i>4.4.2.3 Geslagsafhanklike uitskeiding van orotiensuur.</i>	63
<i>4.4.2.4 Ander invloede op die uitskeiding van orotiensuur.</i>	64
4.5 IDENTIFISERING VAN DEFEKTE WAT POTENSIEËL TOT VERHOOGDE OROTIENSUUR LEI	65
4.5.1 Defekete van die pirimidienmetabolisme	66
4.5.2 Ureumsiklus defekte	66
<i>4.5.2.1 Pasiënt 4/25/6/03</i>	67
<i>4.5.2.2 Pasiënt 11/7/10/03</i>	68
4.5.3 Aminosuurmetaboliese defekte.	73
4.5.4 Koolhidraatmetabolisme defekte	75

4.5.5 Organiese-suurmetabolisme	78
4.5.6 Vetsuurmetabolisme	80
4.5.7 Ander aangebore metaboliese defekte	81
<i>Hoofstuk 5 Gevolgtrekking en bespreking</i>	82
5.1 PROBLEEMSTELLING	82
5.2 BENADERING	82
5.3 FINALE GEVOLGTREKKINGS	84
5.4 GEBRUIK VAN REFERENSIEWAARDES VIR URINÊRE OROTIENSUUR-KONSENTRASIES.	86
BIBLIOGRAFIE	89

LYS VAN FIGURE

Figuur		Bl.
Figuur 2.1.1	<i>Orotiensuur (1,2,3,6-tetrahydro-2,6-diokso-4-pirimidienkarboksielsuur; urasil-6-karboksielsuur).</i>	7
Figuur 2.2.1	<i>Skematiese voorstelling van die interafhanklike verhouding tussen die de novo pirimidienbiosintese, die omskakeling van UMP na nader ribonukleotiede en deoksiribonukleotiede, die herwinning vannaaf sel omset of van voedingsbronne en pirimidien afbraak/degradasie.</i>	9
Reaksie 2.1	<i>Reaksie gekataliseer deur karmamoïelfosfaatsintase</i>	11
Reaksie 2.2	<i>Reaksie gekataliseer deur aspartienuurtranskarbamilase</i>	12
Reaksie 2.3	<i>Reaksie gekataliseer deur dehydro-orotase</i>	12
Reaksie 2.4	<i>Reaksie gekataliseer deur dihidro-orotiensuurdehidrogenase</i>	13
Reaksie 2.5	<i>Reaksie gekataliseer deur orotiensuurfosforibosieltransferase</i>	14
Reaksie 2.6	<i>Reaksie gekataliseer deur orotidien-5-monofosfaatdekarboksilase</i>	15
Figuur 2.3	<i>Skematiese voorstelling van die reaksies en ensieme betrokke by die ureumsiklus.</i>	19
Figuur 4.2.1	<i>(a) Absorpsie spektrum van orotiensuur standaard opgemaak in water, (b) opgemaak in uriene en (c) normale urienmonster. (Metode volgens Rogers en Porter (1968:423-428))</i>	40
Figuur 4.2.2	<i>Vergelyking tussen die metode volgens Duran (1985) en die metode aangepas vanuit Rogers en Porter (1968:423-428).</i>	41

Figuur 4.3.1(a)	<i>Profiel van die skeiding van 12 standarde. 1: Sitosien; 2: Orotiensuur; 3: Uriensuur; 4: Hipoxantien + Guanien; 5: Xantien; 6: Uridien; 7: Timien; 8: IS (Allopurinol); 9: Adenien; 10: Inosien; 11: Guanosen Kondisies soos beskryf deur Rivera et al. (1991:11-14).</i>	44
Figuur 4.3.1(b)	<i>Profiel van die skeiding van twaalf standarde.</i>	45
Figuur 4.3.1(c)	<i>Profiel van 'n kontrole urienmonster.</i>	46
Figuur 4.3.1(d)	<i>Profiel van 'n urienmonster met 200 µmol orotiensuur</i>	47
Figuur 4.3.1(e)	<i>Profiel van 'n urienmonster vanaf 'n pasiënt met hoë konsentrasies orotiensuur</i>	47
Figuur 4.3.1(f)	<i>Profiel van die skeiding van 13 standarde</i>	48
Figuur 4.3.2(a)	<i>Elektroferogram van purien en pirimidien standarde</i>	49
Figuur 4.3.2(b)	<i>Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in normale uriene</i>	50
Figuur 4.3.2(c)	<i>Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in urienevan 'n pasiënt met xantienoksidase defek.</i>	50
Figuur 4.3.2(d)	<i>Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in urienevan 'n pasiënt met dihidropirimidiendehidrogenase defek.</i>	51
Figuur 4.3.2(e)	<i>Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in urienevan 'n pasiënt met orotiensuururie.</i>	51
Figuur 4.3.2(f)	<i>Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in urienevan 'n pasiënt met OTC defek.</i>	52
Figuur 4.3.3 (a)	<i>Totale ioonprofiel en elektronionisasie massaspektrum van orotiensuur.</i>	53
Figuur 4.3.3 (b)	<i>Totale ioonprofiel en elektronionisasie massaspektrum van urasil.</i>	54
Figuur 4.3.3 (c)	<i>Totale ioonprofiel en elektronionisasie massaspektrum van timien.</i>	54

Figuur 4.4.1	<i>Voorstelling van die siftingsprotokol wat gevolg is vir die bepaling van die voorkoms van aangebore metaboliese defekte.</i>	56
Figuur 4.4.2	<i>Verspreidingskurwe van orotiensuur/kreatinien van 'n groep pasiënte wat geen abnormale urinêre metaboliete vertoon het nie en 'n groep wat wel abnormale metaboliete vertoon het.</i>	57
Figuur 4.4.2.1	<i>Verspreidingskurwe van die orotiensuuruitskeiding van pasiënte wat medikasie ontvang het (valproaat, antibiotika, parasetamol).</i>	59
Figuur 4.4.2.2(a)	<i>Verband tussen ouderdom en orotiensuur uitskeiding.</i>	60
Figuur 4.4.2.2(b)	<i>Verspreidingskurwe van oudersomsgroep 1 dag tot 2 jaar.</i>	61
Figuur 4.4.2.2(c)	<i>Verspreidingskurwe van oudersomsgroep 2 jaar tot 6 jaar.</i>	62
Figuur 4.4.2.2(d)	<i>Verspreidingskurwe van oudersomsgroep ouer as 6 jaar.</i>	62
Figuur 4.4.2.4	<i>Verspreidingskurwes van urinêre orotiensuur/kreatinien verhouding van babas met 'n normale metabolietprofiel en babas wat 'n oorganklike babaprofiel vertoon.</i>	64
Figuur 4.5.2.1	<i>Totale ioonprofiel van organiese suur GC-MS analises van pasiënt 4/25/6/03 .</i>	68
Figuur 4.5.2.2(a)	<i>Totale ioprofiel van organiese suur GC-MS analises van pasiënt 11/7/10/03 .</i>	69
Figuur 4.5.2.2(b)	<i>Stamboom van pasiënt 11/7/10/03 .</i>	70
Figuur 4.5.2.2(c)	<i>Orotiensuur/kreatinien konsentrasie van 'n familie met 'n geskiedenis van OTC-defek na 'n allopurinolbelading.</i>	70
Figuur 4.5.3(a)	<i>Verspreidingskurwes van die orotiensuur-konsentrasies van pasiënte wat abnormale</i>	73

urinêre aminosure vertoon het.

Figuur 4.53(b)	<i>Spesifieke waardes van groep1 pasiënte.</i>	74
Figuur 4.5.3(c)	<i>Totale ioonprofiel van organiese suur GC-MS analises van pasiënt met lisien-proteien intoleransie.</i>	75
Figuur 4.5.4(a)	<i>Verspreidingskurwes van die orotiensuurkonsentrasies van pasiënte wat abnormale urinêre koolhidrate vertoon het.</i>	76
Figuur 4.5.4(b)	<i>Spesifieke waardes van groep1 pasiënte.</i>	77
Figuur 4.5.4(c)	<i>Totale ioonprofiel van organiese suur GC-MS analises van pasiënt met glikogeen storingsdefekte.</i>	77
Figuur 4.5.4(d)	<i>Totale ioonprofiel van organiese suur GC-MS analises van pasiënt met galatosomie.</i>	78
Figuur 4.5.5	<i>Verspreidingskurwes van die orotiensuurkonsentrasies van pasiënte wat abnormale urinêre organiese sure vertoon het.</i>	79
Figuur 4.5.6	<i>Verspreidingskurwes van die orotiensuurkonsentrasies van pasiënte wat abnormale vetsuur metaboliete vertoon het.</i>	81

LYS VAN TABELLE

Tabel		Bl.
Tabel 2.1	<i>Ureumsiklus defekte geassosieër met orotiensuururie</i>	21
Tabel 2.2	<i>Referensiewaardes van orotiensuur in uriene</i>	27
Tabel 3.10.1.	<i>Karateristieke van purien, pirimidien en ander UV-absorberende verbindings.</i>	36
Tabel 4.2.1	<i>Persentasie herwinning soos behaal met onderskeidelik die metode volgens Duran et al. (1985) en die aangepaste metode vanuit Rogers en Porter (1968).</i>	42
Tabel 4.4.2	<i>Berekende gemiddelde waardes van pasiënte gebruik in die studie</i>	57
Tabel 4.4.2.2	<i>Gemiddelde orotiensuurkonsentrasies van pasiënte in verskillende ouderdomsgroepe</i>	60
Tabel 4.4.2.4	<i>Gemiddelde orotiensuur/kreatinien van babas wat 'n normale profiel en babas wat 'n oorganklike babaprofiel vertoon het.</i>	64
Tabel 4.5.2	<i>Orotiensuurkonsentrasies gevind in uriene van pasiënte met ureumsiklus defekete</i>	67

LYS VAN AFKORTINGS

ARG	Arginemia
ASA	Argininosuksiensuururie
ATC	Aspartienuurtranskarmilase
ATP	Adenosientrifosfaat
CITR	Sitrullinemia
cm	Sentimeter
CPS	Karbamoïelfosfaatsintase
CTP	Sitidientrifosfaat
dCDP	Deoksisitidiendifosfaat
DHO	Dehidro-orotase
DHODH	Dehidro-orotienuurdehidrogenase
DMB	Dimetielbensaldehyd
DNA	Deoksiribonukleïensuur
dTMP	Deoksitimidienmonofosfaat
dump	Deoksiuridienmonofosfaat
EEG	Elektroensefalogram
EKG	Elektrokardiogram
eV	Elektron Volt
FAD	Flavenadiniendinukleotied
GC-MS	Gaschromatografie Massaspektrometrie
GTP	Guanosientrifosfaat
HCl	Soutsuur
HHH-sindroom	Hiperomitinemie-hiperammonemie-homositrullienurie sindroom
HPLC	Hoë-druk vloeistof chromatografie
KoA	Ko-ensiem A
L	Liter
LPI	Lisienproteïen intoleransie
M	Mol
MCAD	Mediumkettinasiel-KoA-dehidrogenase

ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
NAD	Nikotienamiedadeniendinukleotied
NADPH	Nikotienamiedadeniendinukleotied fosfaat
NAGS	N-asetielglutamiensuursintase
NaOH	Natriumhidroksied
nm	Nanometer
OA	Orotiensuur
ODC	Orotidien – 5' – monofosfaatdekarboksilase
OMP	Orotidien – 5' – monofosfaat
OPRT	Orotaafosforibosieltransferase
OTC	Ornitientranskarnamilase
p-DABA	p-Dimetielaminobensaldehied
PKU	Fenielkenoturie
PPRP	Fosforibosielpirofosfaat
psi	pond per vierkante meter
RNA	Rubonukleïensuur
SDS	Natrium dodecyl sulfaat
TMP	Timidienmonofosfaat
TMS	Trimetiel-S
UMP	Uridienmonofosfaat
UMPS	UMP – sintase
UTP	Uridientrifosfaat
VIGS	Verwonge Immuniteits gebegrek sindroom
µM	Mikromol
mg	Milligram
mmol	Millimol
LC-MS	Vloeistofchromatografie-Massaspektrometrie
UV	Ultraviolet
IS	Interne standard
LKHAD	Langketting-hidroksi-asiel-KoA-dehidrogenase

ABSTRACT

Metabolic screening tests like the ferrichloride- and Benedict tests are commonly used as screening tests for inborn errors of the phenylalanine- and carbohydrate metabolic pathways. Just so the excretion of orotic acid could be used as a screening test for a variety of defects. Increased levels of orotic acid in the urine and blood occur as a result of oroticaciduria, but are also abnormally high in cases of increased levels of ammonia. Elevated ammonia levels are found in a variety of defects, including defects of the urea cycle, amino acid-, carbohydrate- and lipid metabolism. If orotic acid can be used as a screening test it will be possible to identify a variety of defects with this technique. In this study an effort was made to determine which defects might be detected with this technique.

Levels of orotic acid can potentially increase with any defect. Thus methods had to be applied that could potentially identify the whole spectrum of defects as well as accurately quantify the levels of orotic acid in order to evaluate the screening test. A variety of methods were investigated that could be used for the detection and absolute quantification of orotic acid.

Methods for the detection of inborn errors of amino acid- and carbohydrate metabolic pathways as well as organic acid analytical methods has long since been used in the Metabolic Laboratory at Potchefstroom and for this reason it was not necessary to standardise these methods. Since routine analysis for pyrimidines has never been done in the laboratory, and since it had an important role in the verification of the occurrence of orotic acid, this method had to be standardised.

For the aim of this study the levels of orotic acid in the urine of more than 1200 patients were determined. Complete diagnostic analysis were performed and a final diagnoses obtained. The values of orotic acid excreted by patients with abnormalities were compared with the values of orotic acid excreted by patients where no abnormalities were present. The effect of medication, age and sex on the excretion of orotic acid was also investigated. By doing this the typical concentrations for orotic acid excretion of different defects could be determined and a protocol for screening suggested.

OPSOMMING

Metaboliese siftingsstoetse soos ferrichloried- en Benedicttoets word algemeen as siftingsmetode vir aangebore metaboliese defekte van die fenielalanienmetabolisme en koolhidraatmetabolisme gebruik. In dié opsig kan die uitskeiding van orotiensuur as 'n siftingsmetode ook nuttig aangewend word vir 'n verskeidenheid defekte. Orotiensuur verhoog in die uriene en bloed van orotiensuururie, maar is ook abnormaal verhoog indien ammoniak verhoog. Ammoniak verhoog by 'n verskeidenheid defekte wat insluit ureumsiklus-, aminosuur-, koolhidraat- en lipiedmetabolismedefekte. Indien orotiensuurbepaling aangewend kan word as 'n siftingsmetode, is dit potensieel moontlik om 'n groot verskeidenheid defekte met dié tegniek op te spoor. In dié studie is gepoog om vas te stel watter defekte met die metode opgespoor kan word.

Soos in die literatuur bevind is, kan orotiensuur bykans by enige defek potensieel verhoog. Vir die studie moes dus metodes aangewend word wat die volledige spektrum defekte potensieel kan identifiseer en 'n metode moes verkry word wat orotiensuur akkuraat kan kwantifiseer om sodoende die siftingsmetode te evalueer. Vir dié doel is verskeie kolometriese metodes, kolometries ondersoek, wat aangewend is vir die bepaling van orotiensuur. Tegnieke, chromatografies en kapillêre elektroforese, vir die bepaling van die absolute konsentrasie van orotiensuur, is ook ondersoek.

Aminosuur-, koolhidraat- en organiesesuur analitiese metodes word reeds vir baie jare in die laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte te Potchefstroom gebruik en is om dié rede nie nodig gewees om te standaardiseer nie. Pirimidiene is egter nog nie voorheen roetine in die laboratorium uitgevoer nie en hierdie metode was ook belangrik vir die

verifiëring van die voorkoms van orotiensuur en moes dus gestandaardiseer word.

Vir die doel van die studie is meer as 1200 pasiënte se orotiensuurkonsentrasies in uriene bepaal. Volledige diagnostiese analises is vervolgens uitgevoer en 'n finale diagnose is verkry. Die uitskeiding van orotiensuur deur pasiënte met abnormaliteite is vergelyk met pasiënte waarby geen abnormaliteite verkry is nie. Onderzoek is ook ingestel na die invloed van medikasie, ouderdom en geslag op die uitskeiding van orotiensuur. Op dié wyse is bepaal wat die tipiese uitskeidingskonsentrasies van verskillende defekte is en 'n protokol word voorgestel.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

1.1 AGTERGROND.

Die toename in kennis van aangebore metaboliese defekte is logoritmies en hand aan hand hiermee is die toename in diagnostiese toetse wat uitgevoer moet word om die defekte te kan identifiseer. Hierdie toetse is bykans sonder uitsondering duur arbeids- en tydsintensiewe toetse wat net deur hoogs gespesialiseerde laboratoriums uitgevoer kan word.

Ten spyte van die hoë kostes van metaboliese toetse is die alternatief van 'n ongediagnoseerde metaboliese defek se finansiële en emosionele implikasies 'n dryfveer om nogtans die toetse te laat uitvoer. Die potensiaal van behandeling, voorkoming en berusting, indien daar geen behandeling bestaan nie, sal enige ouer en medikus noop om, ten spyte van die hoë kostes, nogtans die toetse te laat uitvoer.

Gesien in die lig van bogenoemde betoog is dit logies dat elke baba, waarvan die kliniese beeld dui op 'n moontlike metaboliese defek, 'n volledige metaboliese ondersoek moet ondergaan. Dit is egter 'n baie vereenvoudiging van die probleem. Geen persoon wat enige kennis het van metaboliese defekte kan "kliniese beeld van metaboliese defekte" definieer nie. In breed word die definisie gestel "indien alle ander faktore, soos infeksie, uitgeskakel is moet gedink word aan metaboliese defekte". Op die oog af mag dit vir die oningeligde persoon baie aanvaarbaar klink, maar as in gedagte gehou word dat die kliniese beeld van tienduisende en selfs honderdduisende babas aan dié definisie voldoen, begin die aanvaarbaarheid van die kriteria onder verdenking kom. As verder uitgelig word dat die kliniese beeld van septisemie nie veel verskil van dié van ernstige metaboliese defekte nie en dat metaboliese defekte tot verhoogde vatbaarheid vir infeksies lei, word dit duidelik dat bogenoemde

kriteria feitlik onbruikbaar is. As verder in gedagte gehou word dat volgens berekeninge daar tans sowat 10% van die potensiële metaboliese defekte gediagnoseer kan word (indien al die moontlike toetse uitgevoer word) wil dit eerder lyk of die aanvraag vir metaboliese toetse moeilik gemotiveer kan word.

Die probleem is nie beperk tot Suid-Afrika nie. Ontwikkelde lande worstel met dieselfde probleem. Die koste-aspek, die feit dat sowat 10% van die verwysde pasiënte gediagnoseer word, die hoë kostes van die vestiging van laboratoriums wat die vermoë het om die analyses uit te voer, is wêreldwyd 'n probleem. In Suid-Afrika is die probleem moontlik net groter aangesien faktore soos ondervoeding en VIGS hier 'n baie groter rol speel. Dit is dus duidelik dat 'n alternatief vir die seleksie van pasiënte of seleksie van spesifieke toetse gevind moet word. Die metode van seleksie moet beide die pasiënt en die instansie wat verantwoordelik is vir die rekening, tot voordeel strek.

Menige metabolomici het al alternatiewe vir die seleksie van pasiënte met potensiële metaboliese defekte voorgestel (Suadubray en Charpentier 2001) en sommige vir die seleksie van die toetse wat uitgevoer moet word (Blom *et al.*, 1989). Beide die benaderings het voor- en nadele. Die seleksie op grond van die kliniese beeld sluit 'n algoritme in waarvan die voorvereistes 'n aantal bykans onbekostigbare toetse (bv. EEG, EKG en breinskandering) noodsaak. Die seleksie van die toetse wat uitgevoer behoort te word, is gegrond op die voorkoms van kliniese beeld wat meer konstant by spesifieke defekte voorkom. Min medici in Suid-Afrika kan egter werklik 'n korrelasie tussen kliniese simptome en nodige diagnostiese toetse maak, gevolglik word die taak aan die laboratorium personeel oorgelaat. Gebrekkige inligting aangaande die kliniese beeld van pasiënte word egter meestal verskaf, gevolglik kan baie min seleksie deur laboratoriumpersoneel uitgevoer word en word meestal al die toetse gedoen. Huidiglik word geen spesifieke seleksieprosedure in Suid-Afrika gevolg nie. Sommige medici dring op 'n volledige ondersoek aan, ongeag

die voorkoms van enige spesifieke kliniese beeld, terwyl ander selfs net diagnostiese toetse vir een spesifieke defek aanvra ongeag of die simptome selfs by aanverwante defekte kan voorkom. Hoewel beide partye die aanvraag kan regverdig, word dit betwyfel of dit werklik in alle opsigte tot die voordeel van die pasiënt en die familie van die pasiënt strek.

1.2 VOORGESTELDE BENADERING VIR DIE SELEKSIE VAN PASIËNTE MET MOONTLIKE METABOLIESE DEFEKTE.

Dit wil voorkom of die gebruik van kliniese simptome en veral alleenlik kliniese simptome die sukses van seleksie van pasiënte en die seleksie van spesifieke toetse beperk. In die studie, en 'n aantal studies wat die studie sal opvolg, word 'n alternatiewe seleksiebenadering voorgestel. Dit blyk dat die kliniese beeld en die potensiele variasie van die kliniese beeld telkens die sukses van die seleksie benadeel. Evalering van kliniese kriteria is in baie opsigte subjektief en sommige voorgestelde seleksiekriteria sluit reeds duur gevorderde toetse in. Die oplossing lê in eenvoudige, meetbare en kwantifiseerbare seleksiekriteria en dus chemiese faktore wat deur die klinikus self, of deur nabygeleë laboratoriums vinnig uitgevoer kan word en spesifieke kliniese kriteria wat waarneembaar is sonder die gebruik van duur diagnostiese toetse. Tradisioneel word metaboliese diagnostiek verdeel in siftingstoetse en diagnostiese toetse. Beide die toetse word tradisioneel deur die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte uitgevoer. Die siftingstoetse is gewoonlik eenvoudige toetse en kan maklik deur persone met minder laboratorium ondervinding uitgevoer word. Indien hierdie resultaat vinnig tot die beskikking van die medikus kan wees, kan die klinikus meer aandag gee aan simptome wat moontlik minder opvallend is, maar tog belangrik is vir die aanvraag van spesifieke toetse.

'n Voorbeeld sal hier ter verduideliking weer gegee word:

Vertraagde ontwikkeling is bykans sonder uitsondering 'n kliniese beeld wat by metaboliese defekte aangetref word. PKU (fenielketonurie) is die mees bekende metaboliese defek en word met reg vermoed indien dié beeld voorkom. Om dié rede word 'n kwantitatiewe fenielalanien bepaling aangevra waarvoor 'n Guhtriekaart verskaf word. Indien die fenielalanienvlakke binne die normaalgrense val kan, as gevolg van die beperkinge van die materiaal wat verskaf is, min ander toetse uitgevoer word. Gevolglik verloop lang tye waartydens ander materiaal verkry moet word voor ander toetse uitgevoer kan word. Indien die klinikus reeds in die spreekkamer of hospitaal die ferrichloriedtoets uitgevoer het, was die teenwoordigheid van PKU uitgeskakel en kon die korrekte materiaal verskaf word wat benodig word vir ander toetse van defekte wat dieselfde kliniese beeld veroorsaak.

Die voorbeeld wat gebruik is, is nie 'n uitsondering nie. Daar bestaan talle eenvoudige siftingstoetse wat enorme inligting kan verskaf en nie veel moeiliker is om uit te voer as die bekende "Labstix " nie. Dit is egter belangrik dat die eenvoudige toetse, in die lig van die groot aantal nuwe defekte wat bekend is, weer geëvalueer moet word en dat die beperkinge maar ook die waarde van die toetse duidelik uitgelig moet word. Die samestelling van 'n battery van die eenvoudige siftingstoetse kan van onskatbare waarde wees in die seleksie van duur toetse wat volg. Pasiënte sal nie slegs finansiële voordeel daaruit trek nie maar ook 'n beter gesondheidsdiens ontvang.

1.3 SELEKSIE VAN EENVOUDIGE SIFTINGSTOETS WAT GEËVALUEER SAL WORD IN DIE STUDIE.

Soos reeds genoem, bestaan deur reeds 'n groot aantal eenvoudige siftingstoetse waarvan een, die ferrichloried toets as voorbeeld gebruik is. Toetse soos α -nitroso- β -naftol-toets vir tirosien en tirosienkataboliete,

Benedictoets vir reduserende stowwe, verskeie toetse vir ketosure en DMB toets vir orotiensuur het die potensiaal om aangewend te word in 'n battery van siftingstoetse vir die seleksie van potensiële metaboliese defekte. Baie van die toetse se waarde lê nie in die opsporing van 'n spesifieke metaboliese defek nie, maar dat metaboliete wat 'n positiewe resultaat lewer sekondêr verhoog as gevolg van 'n metaboliese defek. As voorbeeld ter verduideliking sal die verhoging van tirosien en tirosienmetaboliete gebruik word. Tirosien en tirosienkataboliete verhoog dikwels indien lewerskade teenwoordig is. Die verhoging van die metaboliete vind plaas lank voor lewervergroting werklik fisies waargeneem kan word. Die α -nitroso- β -naftol-toets kan dus aangewend word om metaboliese defekte wat tot lewerskade lei op te spoor. Defekte soos tirosienemie tipe I, glikogeenstoringsdefekte, en selfs peroksisomale defekte val in dié groep en die toets kan aanduidend van die defekte wees.

Daar is dus verskeie siftingstoetse wat in aanmerking kom vir die samestelling van 'n seleksiewyse op grond van eenvoudige siftingstoetse. Vir die studie moes egter een van die potensiële siftingstoetse uitgesonder en die potensiaal daarvan ondersoek word. Faktore wat in ag geneem is met die aanvang van die studie, is die voorkoms van spesifieke metaboliese defekte in Suid-Afrika en die ernstige aard van spesifieke defekte. Sederd 1981 is meer as 20 000 pasiënte deur die Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte te Potchefstroom ondersoek vir metaboliese defekte. Defekte soos , propioonasidemie, isovaleriaanasidemie, ornitientranskarnilase (OTC) defek en ureumsiklusdefekte het geblyk om die hoogste voorkoms in Suid-Afrika te hê. Bogenoemde defekte word ook beskou as die ernstigste defekte en lei dikwels tot die dood van pasiënte. Defekte soos isovaleriaanasidemie en OTC-defek en selfs ureumsiklusdefekte en is egter, indien hulle vroegtydig opgespoor word en korrek behandel word, goed behandelbaar. Die hoë voorkoms van die defekte, ernstige aard van die defekte en potensieel suksesvolle behandeling van die defekte het die deurslag gegee aan die keuse van die onderwerp vir die studie.

'n Siftingstoets vir meer as een metaboliese defek benodig 'n gemeenskaplike uitskeiding van verhoogde of verlaagde konsentrasies van 'n metaboliet of metaboliete. Bogenoemde metaboliese defekte is uiteenlopend van aard; nogtans is daar een gemeenskaplike eienskap, naamlik verhoogde ammoniakvlakke wat by al die defekte aangetref word. Bloed ammoniakvlakke sou dus potensieel aangewend kan word as 'n siftingstoets vir die defekte. Bepaling van bloedammoniakvlakke is egter ingewikkeld en beslis nie geskik vir 'n siftingstoets nie. Om dié rede is besluit op die bepaling van urinêre orotiensuur wat gepaardgaan met die verhoging van sellulêre ammoniak. Verskeie eenvoudige toetse bestaan wat orotiensuur relatief akkuraat kan bepaal wat dit uiters geskik maak as 'n siftingstoets vir metaboliese defekte wat gepaard gaan met verhoogde ammoniakvlakke.

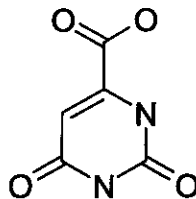
In hierdie studie sal die gebruik van orotiensuurbepaling vir die opsporing van metaboliese defekte, wat gepaard gaan met verhoogde ammoniakvlakke, ondersoek word. In Hoofstuk 2 sal 'n literatuurstudie van orotiensuurmetabolisme, metaboliese defekte wat met verhoogde orotiensuur gepaardgaan en metaboliese defekte wat tot verhoogde orotiensuuruitskeiding lei as gevolg van verhoogde ammoniakvlakke weergegee word. In Hoofstuk 3 sal toetse wat vir die bepaling van orotiensuur aangewend kan word, ondersoek word. Tegnieke wat gebruik is vir die bepaling van die absolute konsentrasie, sal ook bespreek word. Die resultate van die studie sal in Hoofstuk 4 bespreek word en in Hoofstuk 5 sal 'n finale gevolgtrekking weergegee word.

Hoofstuk 2

LITERATUURSTUDIE

2.1 INLEIDING

Orotiensuur (1,2,3,6-tetrahidro-2,6-diokso-4-pirimidienkarboksielsuur; urasil-6-karboksielsuur) (Figuur 2.1.1) is een van die eerste intermediêre in die *de novo* pirimidienbiosintese-weg en word vanuit die dogtermolekules karbamoïelfosfaat en aspartiensuur gevorm (Smith et al., 1972:1003). Normaalweg word orotiensuur omgeskakel na uridienmonofosfaat (UMP) en vandaar na die nukleïensure asook ander pirimidienverbindings en ko-faktore (Figuur 2.2.1). Behalwe die omgekeerde van die weg in Figuur 2.2.1 is geen ander anabolismeweg vir orotiensuur bekend nie. Die omset van orotiensuur in die mens word geskat as ongeveer 0.6 g per 24 uur (Weissman et al., 1962:1546). Orotiensuur word nie in normale weefsel waargeneem nie en onder normale omstandighede word minder as 2 mg per 24 uur in uriene uitgeskei (Lotz et al., 1963:197, 194 ; Beardmore, T.D., Kelly, W.N., 1971:795).



Figuur 2.1.1 Orotiensuur (1,2,3,6-tetrahidro-2,6-diokso-4-pirimidienkarboksielsuur; urasil-6-karboksielsuur).

Orotiensuur is die eerste keer in melk waargeneem (Biscaro, G., Bellani, E., 1905:64). Beesmelk het 'n redelike hoë inhoud (50 - 100 mg/l) orotiensuur, waarvan dit die 97 % van die nukleotiedinhoud uitmaak (Kabata et al., 1962:64). Kommersiële poeiermelk het ook 'n hoë inhoud, 100 - 130 mg/100 g poeier (Okonkove, P.O., Kinsella, J.E., 1969:532). In vergelyking hiermee bevat moedersmelk slegs spoorhoeveelhede

orotiensuur, alhoewel dit 'n relatief hoë inhoud van ander pirimidienverbindinge bevat, veral sitidienmonofosfaat en uridienmonofosfaat. Orotiensuur kom ook in graan asook in groentesoorte soos wortels en beet voor. Dit is 'n relatief onoplosbare verbinding (oplosbaar in water tot en met 1.7 g/L) en word nie maklik geabsorbeer nie.

Die voedingswaarde van orotiensuur is gesetel in die rol wat dit speel as groeifaktor in voedingsdefekte asook in die rol wat dit speel as 'n beskermende agent vir die lewer (Hassan, A.S., Milner, J.A., 1981:739). Orotiensuur verbeter die simptome wat ontstaan as gevolg van 'n tekort in foliensuur of kobalamien (Van der Weyden et al., 1979:85) en verhoog intrasellulêre vlakke van nukleotiede en nukleinsure.

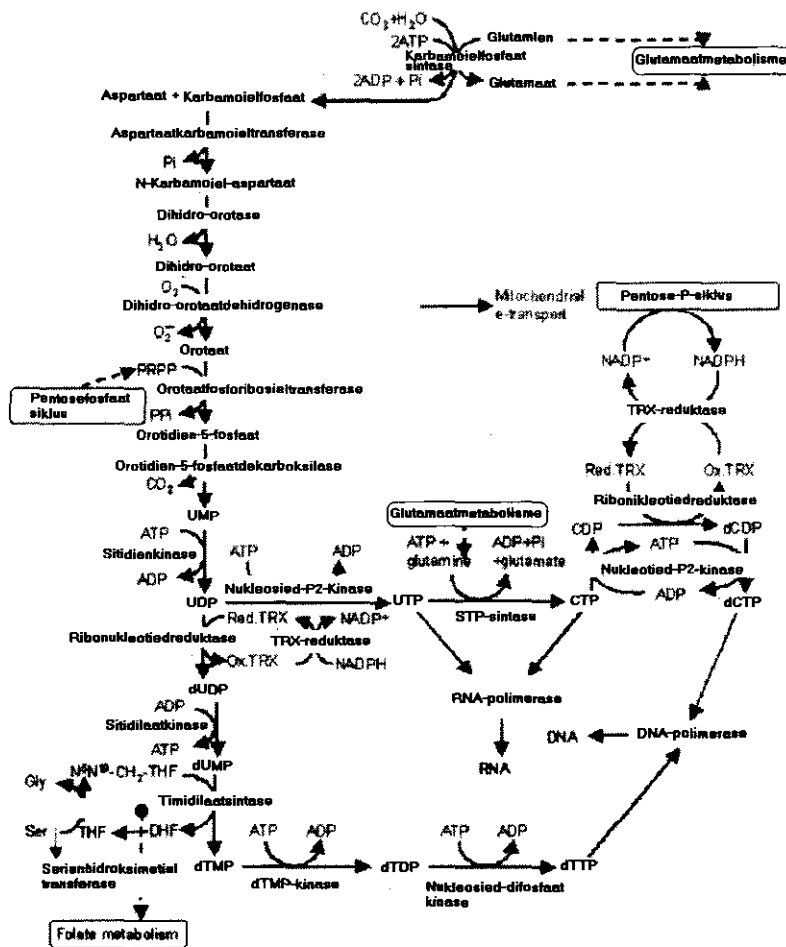
Groot dosisse magnesiumsout van orotiensuur (3 g/dag) verbeter linker ventrikulêre funksie en oefeningstoleransie merkwaardig in pasiënte met koronêre hartdefekte. Dit is waarskynlik bewerkstellig deur 'n tekort in nukleotiedvoorgangers te korrigeer, of deur miokardiale energievoorsiening te verhoog (Geiss et al., 1988:153). Orotiensuur is al gebruik in die behandeling van neonatale geelsug (Hinkel et al., 1972:2414), hiperlipoproteïenemia (Muller, G., 1984:269), degeneratiewe retinale defek (Collip, P., 1987:235), en jig (Kelly, W.N., Wyngaarden, J.B., 1971:119). Daar word steeds na orotiensuur verwys as vitamien B13 (Vandamm, E.J., 1992:313), maar omrede dit deur die menslike liggaam en intestinale flora vervaardig word, word dit nie werklik as 'n vitamien erken nie.

Herhaalde blootstellings aan verhoogde konsentrasies orotiensuur kan nadelige gevolge hê. Toevoeging van orotiensuur tot die diëte van rotte, het hepatiese steatose tot gevolg gehad (Aoyama, Y., Wada, M., Morifuji, M., 2001:2166). Orotiensuur bevorder hepatiese karsinogenese in rotte wat met 1,2 dimetiel-hidrazien behandel is (Rao, P.M., 1984:173), dit verbeter preneoplastiese en neoplastiese letsels in hamsters (Kokkinakis,

D.M., Albores-Saavedra, J., 1994:5324) en stimuleer proliferasie van K562 leukemiese selle *in vitro*.

2.2 METABOLISME VAN OROTIENSUUR

Die interafhanklike verhouding tussen die ensieme van die *de novo* sintese, interomskakeling, herwinning en degradasie in die pirimidienmetabolisme, word in Figuur 2.2.1 weergegee.



Figuur 2.2.1 Skematiese voorstelling van die interafhanklike verhouding tussen die *de novo* pirimidienbiosintese, die omskakeling van UMP na nader ribonukleotiede en deoksiribonukleotiede, die herwinning vannaf sel omset of van voedingsbronne en pirimidien afbraak/degradasie.

2.2.1 De Novo biosintese van pirimidiene

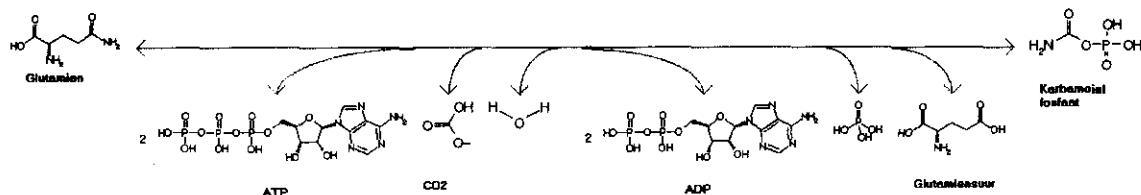
2.2.1.1 Inleiding

Drie strukturele gene kodeer vir die ses reaksies van die *de novo* pirimidienbiosintese. Die eerste geen kodeer vir 'n groot multifunksionele proteïen wat die eerste drie ensieme van die weg bevat; karbamoïelfosfaatsintase (CPSII), (aspartaatkarbamoïeltransferase) aspartienuurtranskarbamilase (ATC) en dehidro-orotase (DHO). Die tweede geen kodeer vir dihidro-orotienuurdehidrogenase (DHODH). Die derde geen kodeer vir die laaste twee ensieme van die *de novo* sinteseweg; orotaatfosforibosieltransferase (OPRT) en orotidien-5'-monofosfaatdekarboksilase (ODC). Die *de novo* pirimidiensintese word geskat op 4 tot 16 mmol per dag (Bono et al., 1964:1486) of 450 tot 700 mg per dag, gelykstaande aan die daaglikse purienaanvraag (Smith, L.J., 1973:764).

2.2.1.2 Eerste-, tweede- en derde reaksiestappe:

Karbamoïelfosfaatsintase, Aspartienuurtranskarbamilase en Dihidro-orotase

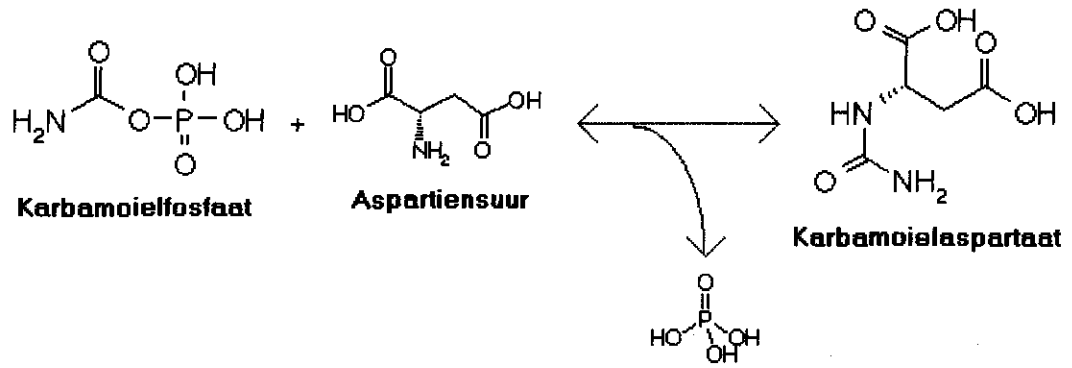
Orotienuur is die vierde intermediêr in die *de novo* pirimidiensinteseweg. Karbamoïelfosfaatsintase (EC. 2.7.2.9) kataliseer die eerste reaksie in pirimidienbiosintese. Karbamoïelfosfaat word gevorm vanaf die ammoniakgroep van glutamien, CO₂ en ATP. Twee ATP's is nodig vir die reaksie (Coleman et al., 1978:121 - 134; Galjaard, 1980:419 - 420). Hierdie reaksie word skematies voorgestel in reaksie 2.1, 2.2 en 2.3.



Reaksie 2.1 Reaksie gekataliseer deur karbamoïelfosfaatsintese

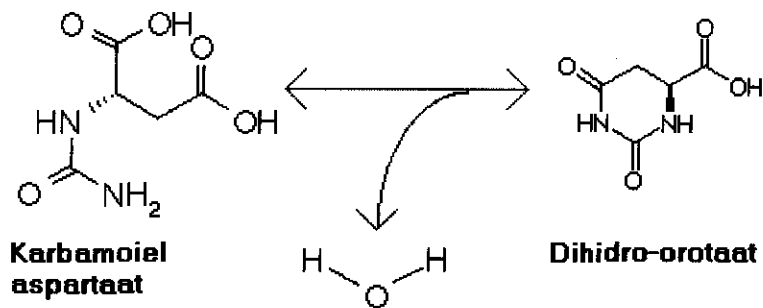
Die ensiem word na verwys as CPS II om dit te kan onderskei van CPS I. CPS I is 'n mitochondriale ensiem wat voorkom in lewer en niere en betrokke is by die ureumsiklus. Dit vorm karbamoïelfosfaat vanaf ammoniak en CO₂ en is die snelheid bepalende stap in die ureumsiklus, maar kan ook 'n bydrae tot die karbamoïelfosfaat (wat betrokke is by pirimidienbiosintese) lewer. As gevolg van die volgende twee reaksies van die kompleks (CPS II), word al die karbamoïelfosfaat wat deur CPS II gevorm word, gebruik in pirimidiensintese. CPS II lewer dus geen of baie min bydrae tot karbamoïelfosfaat wat betrokke is by die ureumsiklus. Die aktiwiteit van CPS II is die tempo bepalende reaksie in die *de novo* sintese van UMP behalwe wanneer ATP vlakke verhoog is terselfertyd as wat uridiennukleotied- en fosforibosielpirofosfaat (PP-ribose-P) vlakke verlaag is. Onder dié kondisies akkumuleer orotiensuur en OPRT is die tempo bepalende reaksie (Jones, M., 1971:19). 'n Toename in die beskikbaarheid van karbamoïelfosfaat gevorm deur KPS I, soos dit gebeur in verskeie ureumsiklusdefekte, veroorsaak 'n toename in die tempo van die *de novo* pirimidiensintese (Kelley, W., 1983:1202). Hierdie bydrae het waarskynlik te doen met verhoogde groei wat gestimuleer word deur verhoogde proteïeninname. Hierdie aspek speel 'n belangrike rol in die studie en sal later in die hoofstuk in meer detail bespreek word.

Die tweede reaksie in die pirimidienbiosinteseweg is die onomkeerbare vorming van N- karbamoïel-L-aspartienuur vanaf karbamoïelfosfaat en L-aspartienuur (Reaksie 2.1b). Die reaksie word gekataliseer deur aspartienuurtranskarbamilase (ATC) (EC. 2.1.3.2).



Reaksie 2.2 Reaksie gekataliseer deur aspartienuurtranskarbamilase

Die derde reaksie word gekataliseer deur dehidro-orotase (DHO) (EC. 3.5.2.3) wat ringsluiting effekteer om 4,5-dihidro-orotienuur te vorm (Reaksie 2.1c). Geen ko-faktore is nodig vir die reaksie nie (Suttle et al., 1989:1095 - 1096).



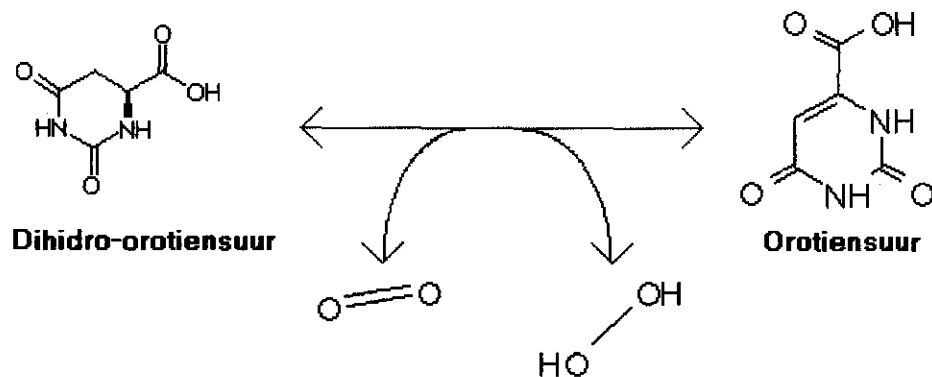
Reaksie 2.3 Reaksie gekataliseer deur dehidro-orotase

KCPS II, tesame met die ensieme vir die tweede (ATC) en derde (DHO) reaksies, vorm 'n multifunksionele proteïen. Die proteïen het drie verskillende katalitiese domeine in die volgorde van NH₃ - DHO - CPS II - ATC - COOH. DHO, CPS II en ATC verteenwoordig elk 'n aminosuursyketting wat ooreenstem met die DHO, CPS II en ATC ensieme. Die proteïen kom ook voor in sy natuurlike vorm as trimere of heksamere (Van Gennip, 1981:22 - 23).

Aangesien die ensieme vir die drie agtereenvolgende reaksies gekombineer is om 'n trifunksionele proteïen te vorm en CPS II die tempo bepalende stap kataliseer, word karbamoïelfosfaat vinnig omvorm tot dihidro-orotienuur. (Suttle et al., 1989:1095 - 1096).

2.2.1.3 Vierde reaksiestap: Dihidro-orotienuurdehidrogenase

Dihidro-orotienuurdehidrogenase (DHODH) (EC. 1.3.3.1) kataliseer die oksidasie van dihidro-orotienuur na orotienuur (OA) (Reaksie 2.4). Die ensiem benodig verskeie ko-faktore, insluitend flavienadiniendinukleotied (FAD) en nikotienamiedadenindinukleotied (NAD). Sommige bronne beweer dat waterstofperoksied gedurende dié reaksie gevorm word. Hierdie proteïen kom voor op die buitenste oppervlak van die binnemembraan van die mitochondrion. Indien NAD as elektronontvanger optree en nou verbind met die elektrontransportketting, kan dit elektrone direk aan die elektrontransportketting oordra (Miller, 1978:63 - 69).

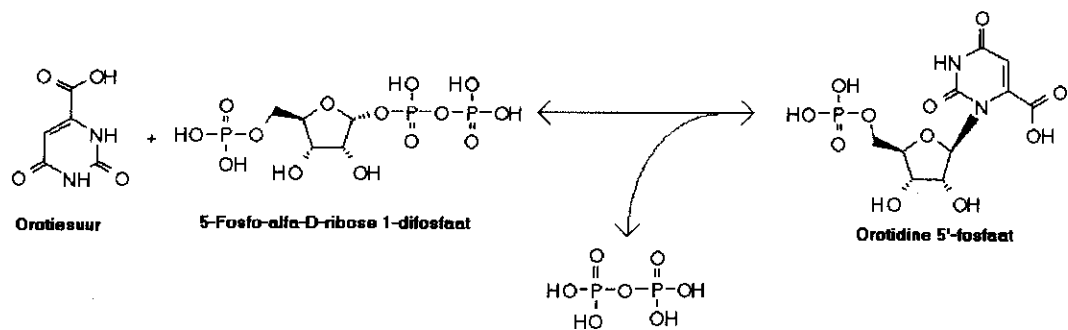


Reaksie 2.4 Reaksie gekataliseer deur dihidro-orotienuurdehidrogenase

2.2.1.4 Vyfde- en sesde reaksiestappe:

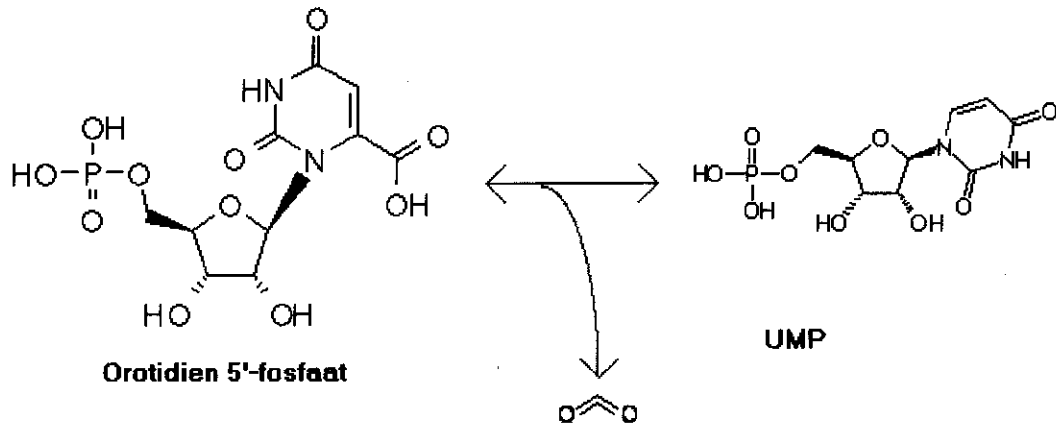
Orotiensuurfosforibosieltransferase en Orotidien-5'-monofosfaatdekarboksilase

Die uiteindelijke bestemming van intrasellulêre orotiensuur is die omskakeling na uridien -5'- monofosfaat (UMP). Die reaksie word gekataliseer deur UMP-sintase. UMP-sintase is 'n bifunksionele sitosoliese proteïen en bevat die aktiwiteite van beide orotiensuurfosforibosieltransferase (OPRT) (EC. 2.4.2.10) en orotiensuur-5'monofosfaatdekarboksilase (ODC) (EC. 4.1.1.23) (Dileepan, K.N., Kennedy, J., 1983:1). OPRT maak gebruik van 5-fosforibosiel-1-pirofosfaat (PP-ribose-P) om die ribose -5'-monofosfaat gedeelte tot orotiensuur te voeg en sodoende orotidien-5'-monofosfaat (OMP) te vorm (Reaksie 2.5).



Reaksie 2.5 Reaksie gekataliseer deur orotiensuurfosforibosieltransferase

ODC stel CO₂ vry vanaf OMP om UMP te vorm (Reaksie 2.6) wat omgeskakel word na al die ander nodige pirimidiennukleotiede (Vreken et al., 1999:251).



Reaksie 2.6 Reaksie gekataliseer deur orotidien-5-monofosfaatdekarboksilase

2.2.2 Interomskakeling

Die pirimidienkern in UMP kan omgeskakel word na al die ander nodige pirimidiennukleotiede óf laasgenoemde kan herwin word vanuit bronne in dieet of selomset. Pirimidienmononukleotiede word verder gefosforileer deur pirimidienmonofosfaatkinase en pirimidiendifosfaatkinase.

Sitidiennukleotiede word gevorm deur die werking van sitidientrifosfaatsintetase (EC. 6.3.4.2) vanaf uridientrifosfaat. Reduksie van ribonukleotiede na deoksiribonukleotiede word bewerkstellig deur die werking van ribonukleosieddifosfaatreduktase (EC. 1.17.4.1), wat dUMP en dCDP vorm.

Timidiennukleotiede word gevorm deur timidilaatsintetase (EC. 2.1.1.45), wat dTMP vorm vanaf dUMP. 5, 10-Metileen-5,6,7,8-tetrahydrofolaat is 'n kofaktor vir die reaksie. dTMP kan verder gefosforileer word deur timidienmonofosfaatkinase (EC. 2.7.4.9). Trifosfaatkukleotiede vorm DNA en RNA deur die werking van gepaste nukleotidieltransferases.

2.2.3 Pirimidienherwinning

Pirimidienherwinning speel 'n belangrike rol in hierdie metaboliese weë, aangesien slegs 1 mol ATP nodig is om 1 mol UMP te herwin in vergelyking met die 5 mol ATP wat nodig is om 1 mol UMP te sintetiseer tydens die *de novo* biosintese van pirimidiene. Drie hoofherwinningsreaksies vind plaas in pirimidienmetabolisme. Die eerste ensiem kataliseer die reaksie van timidien na TMP en die tweede ensiem kataliseer die reaksie van uridien na UMP en sitidien na CMP.

Timidienkinase (EC. 2.7.1.21) kataliseer die omskakeling van timidien na TMP, terwyl uridienkinase (EC. 2.7.1.48) die omskakeling van sitidien na CMP en uridien na UMP kataliseer. Beide die ensieme benodig Mg^{2+} en ATP as ko-faktore (Anderson, 1978:314 - 321; Bresnick, 1978:360 - 365; Cheng, 1978:365 - 371).

Die aktiwiteit van timidienkinase is verhoog in lewer wat besig is om van skade te herstel en ook viraal geïnfekteerde selle, ensovoorts. Twee tipes timidienkinases is bekend. Een tipe kom voor in die mitochondria, terwyl die ander in die sitosol voorkom.

Uridienkinase toon ook verhoogde aktiwiteit in selle wat 'n vinnige groeitempo toon. Dit blyk dat hierdie kinase die tempo bepalende stap is in die vorming van die trifosfaat analoë vanaf die nukleosiede. Uridienkinase word geïnhibeer deur CTP en UTP en dit is ook gevind dat Mg^{2+} en ATP die beste ko-faktore vir die ensiem is (Anderson, 1978:314 - 321).

2.2.4 Pirimidienafbraak/degradasie

Tydens pirimidiendegradasie word sitidien, uridien en timidien gedegradeer na sitosien, urasil en timien respektiewelik. Urasil en timien word daaropeenvolgens afgebreek om β -alanien en β -amino-isobottersuur te vorm.

Sitidiendeaminase (EC. 3.5.4.5) kataliseer die reaksie om sitidien om te skakel na uridien en sitosiendeaminase kataliseer die reaksie wat sitosien omskakel an urasil.

Uridienfosforilase (EC. 2.4.2.3) kataliseer die omskakeling van uridien na urasil en timidienfosforilase (EC. 2.4.2.4) kataliseer die omskakeling van timidien na timien. Uridienfosforilase kom hoofsaaklik in die sitosol van selle van die dunderm, hart, niere, milt, lewer en brein voor (ensiemaktiwiteit neem af in hierdie volgorde). Die ensiem het 'n molekulêre gewig van 102.5 - 11- kDa en bestaan uit vier subeenhede, elk met 'n molekulêre gewig van 26 kDa (Yamada, 1978:423 - 431).

Urasil en timien word in drie stappe parallel gekataboliseer. In die eerste stap word hulle gekataboliseer na hul dihidro-analoë deur die ensiem dihidro-pirimidiendehidrogenase (EC. 1.3.1.2). Die reaksies is NADPH-afhanklik (Adolph et al., 1991:311 - 314; Van Gennip et al, 1991:15 - 19). Dihidro-urasil en dihidrotimien word dan gekataboliseer na onderskeidelik ureidopropionaat en ureidoisobottersuur deur dihidropirimidinase (EC. 3.5.2.2). Slegs 'n enkele watermolekule is nodig in elke reaksie waartydens die ringstruktuur gebreek word (Suttle et al., 1989:1098 - 1099).

Die finale stap in die degradasieweg word gekataliseer deur 3 - ureidopropionase (EC. 3.5.1.6). Tydens die reaksie, waarin nog 'n molekule water gebruik word, word β -alanien gevorm vanaf ureidopropioonsuur en β -amino-isobottersuur word gevorm vanaf ureidoisobottersuur. Die reaksie genereer CO₂ en ammoniak (Adolph et al., 1991:311 - 314; Van Gennip et al., 1991:15 - 19).

2.2.5 Regulering van die pirimidienmetabolisme

Die meeste van die regulering van pirimidienmetabolisme vind in die *de novo* biosintese-weg plaas. Reaksies 2 - 5 word geïnhibeer deur verhoogde konsentrasies van pirimidiennukleotiede. Reaksie 2 word

gestimuleer deur PRPP en ATP, terwyl puriennukleotiede en -nukleosiede die reaksie inhibeer. Reaksie 4 word geïnhibeer deur 5-metielorotiensuur en allopurinol inhibeer die vorming van UMP (Reaksie 6).

Regulering van die interomskakeling, degradasie en herwinning van pirimidien vind ook plaas. Die hoofareas van regulasie is by die reaksie waartydens CTP vanaf UTP gevorm word. CTP-sintetase word deur CTP geïnhibeer en gestimuleer deur ATP en GTP. CTP en UTP inhibeer die herwinning van sitidien en uridien. Die meeste van die regulering vind plaas in die vorm van terugvoerregulering, terwyl 'n verhoogde tempo in seldeling verskeie reaksies in die pirimidienmetabolisme stimuleer (Dry, J. 1994:56).

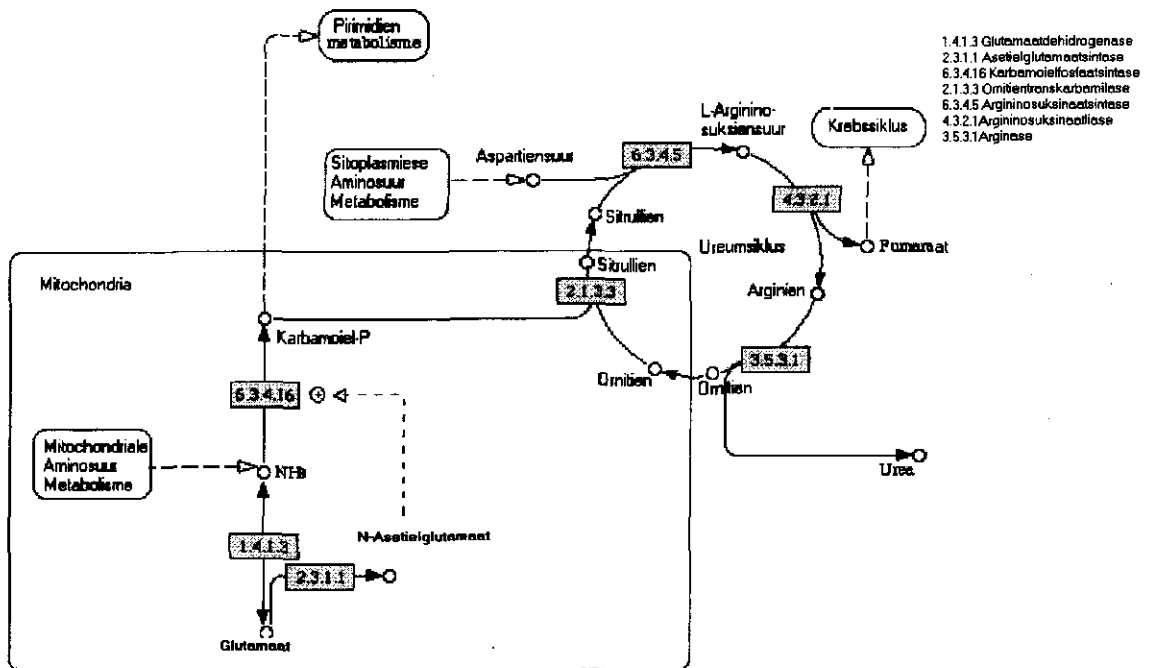
2.3 DIE SKAKEL TUSSEN NH₃ EN OROTIENSUUR

Abnormale hoë vlakke van orotiensuur word gevind in toestande wat lei tot hiperammonemie en 'n opeenhoping van intramitochondriale karbamoïelfosfaat, wat tot in die sitosol kan diffundeer en *de novo* pirimidienbiosintese stimuleer. In die meeste gevalle word orotiensuururie in mense veroorsaak deur aangebore defekte van die ensieme betrokke in die ureumsiklus na die sintese van intramitochondriale karbamoïelfosfaat. 'n Skematiese voorstelling van die ureumsiklus word in Figuur 2.3 weergegee.

Die ureumsiklus het twee hoof funksies: dit bevat, gedeeltelik, die biochemiese reaksies nodig vir die *de novo* biosintese en degradasie van arginien; en dit inkorporeer stikstofatome, wat nie vir netto biosintetiese doeleindes gebruik word nie, in ureum, wat as stikstofafvalproduk dien. Dit verhoed met ander woorde die akkumulering van toksiese stikstofbevattende verbindings wat veral ammoniak is.

'n Defek in die ureumsiklus het twee gevolge: Arginien word 'n essensiële aminosuur (behalwe in die geval van 'n arginasedefek waar 'n defek in die ensiem lei tot 'n onvermoë om arginien af te breek); en stikstofatome

akkumuleer in 'n verskeidenheid molekules. Die patroon verskil afhangend van watter spesifieke ensiem defektief is, maar plasmavlakke van ammoniak, glutamien en glutamiensuur verhoog in alle ureumsiklusdefekte wat nie onder metabolisme beheer is nie.



Figuur 2.3 Skematiese voorstelling van die reaksies en ensieme betrokke by die ureumsiklus.

'n Blokkasie in die ureumsiklus, na CPS I, veroorsaak akkumulering van intramitochondriale karbamoïelfosfaat. Die karbamoïelfosfaat diffundeer tot in die sitoplasma waar dit pirimidienbiosintese stimuleer. Pirimidiennukleotiedbiosintese word normaalweg beheer deur terugvoerinhibisie van CPS II. Hierdie beheermeganisme verloor dus beperking, tydens 'n ureumsiklus defek, die influks van karbamoïelfosfaat in die *de novo* pirimidienbiosintese. As 'n gevolg hiervan word fosforibosielpirofosfaat (PRPP) uitgeput. Dit beperk die fluks deur die orotiensuur PRPP-transferase reaksie wat die akkumulering van orotiensuur tot gevolg het (Figuur 2.3).

2.4 DEFEKTE WAT AANLEIDING GEE TOT HIPERAMMONEMIE

Aangebore hiperammonemiese defekte word veroorsaak deur spesifieke metaboliese defekte in die ureumsiklus of in metaboliese weë verwant aan hierdie siklus of aanleiding kan gee tot vorming van verbindings wat die siklus kan inhibeer. Die moontlikheid van verhoogde ammoniak kan moontlik ook die gevolg wees van verlaagde energieproduksie vanuit primêre energiebronne soos glukose en vetsure met 'n gevolglike verhoging van aminosuorkatabolisme. Aangebore hiperammonemie kan hoofsaaklik in vier groepe verdeel word:

2.4.1 .Ureumsiklus defekte: karbamoïelfosfaatsintetase I (CPS I) defek, ornitientranskarbamilase (OTC) defek, argininosuksiensuursintase defek (sitrullinemia, CITR), argininosuksiensuurliase defek (argininosuksiensuururie, ASA), arginase defek (arginemia, ARG) en N-asetielglutamiensuursintase (NAGS) defek

In die meeste gevalle ontstaan orotiensuururie in mense as gevolg van aangebore defekte van die ensieme betrokke in die ureumsiklus na die sintese van intramitochondriale karbamoïelfosfaat. Die algehele voorkoms van die aangebore defekte word geskat as 1 in 9 400 (Brusilow, S., Maestri, N.E., 1966:127). 70 % van die gevalle kan toegeskryf word aan ornitientranskarbamilase defekte, 16 % aan argininosuksiensuursintetase defekte, 3 % aan argininosuksiensuurliase defekte en 2 % aan 'n arginase (Tabel 2.1). Die kliniese beeld van die pasiënte stem baie ooreen en hou verband met hiperammonemie wat gemeenskaplik is aan al die defekte. Die variasie in die simptome hang waarskynlik af van genomiese faktore asook van die metaboliese gevolg van die verskeie ensiemdefekte.

Tabel 2.1 *Ureumsiklus defekte geassosieër met orotiensuururie*

Ensiem defek	Persentasi e voorkoms	Insidensie
Ornitientranskarnilase (OTC defek)	70	1:14 000
Argininosuksiensuursintetase (Sitrullinemie)	16	1:57 000
Argininosuksienuurliase (Argininosuksiensuururie)	12	1:70 000
Arginase (Arginemia)	2	1:363 000
TOTAAL	100	1:9 400

Aangepas vanuit Bruwilow en Maestri (1966:127)

OTC defekte is in een opsig uniek. Die defek is 'n X-gekoppelde defek wat baie vroeë dood van seuntjies veroorsaak en ook tot die dood van dogters en selfs volwasse vroue kan lei tydens vastende toetstande of verhoogde proteïeninname. Karbamoiëlfosfaat hoop op tydens die defek, maar is nie opspoorbaar in uriene met die gebruikte analitiese metodes nie. Orotiensuur is een van die belangrikste diagnostiese metaboliëte by OTC defek.

2.4.2 Transport defekte van dibasiese aminosure: hiperdibasiese aminosuururie (lisien-proteïen intoleransie, LPI) an hiperornitinemie-hiperammonemie-homositrullienurie (HHH) sindroom.

Lisienproteïenintoleransie (LPI) is 'n baie seldsame outosomaal resessiewe defek. Die defek word veroorsaak deur defektiewe transport van dibasiese aminosure (lisien, ornitien en arginien) by die basolaterale membrane van epiteelselle in die renale buise en dunderm. LPI kom veral voor in Finland, maar LPI families is ook bekend in die Suide van Italië en in Japan. Die metaboliese afwyking word gekenmerk deur 'n afname in intestinale absorpsie van dibasiese aminosure, 'n toename in renale uitskeiding en lae plasmakonsentrasies van dibasiese aminosure, orotiensuururie en wanfunksie van die ureumsiklus wat hiperammonemie tot gevolg het.

Die eerste pasiënt met die kombinasie van 'n verhoging in plasma ornitienkonsentrasie, postprandiale hiperammonemie en homositrullienurie (HHH sindroom) is beskryf deur Shih en medewerkers in 1969 (Shih et al., 1969:83). Die defek word waarskynlik veroorsaak deur verlaagde ornitientransport oor die mitochondriale wand. Gevolglik word karbamoïelfosfaat nie vanuit die mitochondria verwyder nie. Tans is meer as veertig pasiënte vanuit 'n verskeidenheid etniese herkoms bekend (Shih et al., 1969:83; Oberholzer, V.G., Briddon, A., 1978:411; Dionisi Vici et al., 1987:364). Die sindroom word onderskei van die defekte van die ureumsiklus op grond van die verhoging in plasma ornitienkonsentrasies. Postprandiale hiperammonemie en homositrullienurie onderskei dit van giraatatrofie met hiperornitienemie.

Plasma ornitienkonsentrasies op 'n onbeperkte dieet varieer vanaf 200 tot 1020 μM . Beperking van proteïeninnames veroorsaak 'n afname in hiperornitienemie en met ekstreme beperkings kan waardes die normaalvlakke bereik (Shih et al., 1968:2247; Dionisi et al., 1987:364; Hommes et al., 1982:41). Die vlakke van ammoniak in die plasma, tydens vastende toestande, is gewoonlik normaal al is die gemiddelde waarde effens hoër in pasiënte as in kontrolepersone. Ammoniakvlakke neem toe na die inname van proteïene en 'n hoë proteïendieet het chroniese hiperammonemie tot gevolg. Ornitienuitskeiding is hoogs varieerbaar. Die uitskeiding van orotiensuur, wat 'n aanduiding is van karbamoïelfosfaat opeenhoping, is verhoog. Dit kan moontlik aandui dat intramitochondriale karbamoïelfosfaat ondergebruik is. Die urinêre orotiensuurvlakke is dikwels verhoog al is die ammoniumvlakke normaal (Scriver et al., 1995:1884).

Die basiese defek is die transport van ornitien oor die binneste mitochondriale membraan tot in die mitochondriale matriks. Dit veroorsaak 'n afname in die sintese van sitrullien en inhibeer ammoniak detoksifisering. OCT, die hoof ornitien-kataboliserende ensiem, is geleë in die mitochondria. 'n Afname in die ingang van ornitien in die mitochondria

lei tot die opeenhoping van ornitien in die sitosol en ekstraselluêre vloeistof. Hierdie model voorspel dat indien die sitosoliese ornitienvlakke verhoog word, kan dit transmitochondriale ornitientransport aandryf en sodoende die pasiënt se ureumsiklusfunksie verbeter.

2.4.3 Organiese-suururieë: (bv. propioonsuururie, metielmaloonsuururie, isovaleriaansuururie).

Verskeie organiese-suururieë word geassosieer met hiperammonemie waarvan die bekendste propioonasidemie (propioniel-KoA-karboksilase defek), metielmaloonasidemie (metielmaloniel-KoA-rasemase of mutase defek) en isovaleriaanasidemie (isovaleriaan-KoA-dehidrogenase defek) is, hoewel dit nie die enigste organiese-suur metaboliese defekte is wat tot verhoogde ammoniakvlakke aanleiding gee nie. Die werklike rede vir die verhoogde ammoniak is onduidelik. Verskeie outeurs het bevind dat organiese sure soos propioonsuur en isovaleriaansuur en veral dan die KoA-esters van die genoemde sure tot die produksie van N-asielglutamiensuur verwante metaboliete soos N-propionielglutamiensuur en N-isovaleriaanglutamiensuur lei. N-Asetielglutamiensuur tree as aktiveerder vir die ensiem karbamoïelfosfaatsintetase op. Die moontlikheid dat die ongewone N-asielglutamiensuur hierdie ensiem kan inhibeer, is al bewys. Hoewel hierdie moontlike meganisme 'n rol mag speel, is daar min konkrete bewyse wat die bewering ondersteun. Die moontlikheid dat die defekte tot verlaagde energieproduksie lei en gevolglik tot verhoogde aminosuorkatabolisme en verhoogde ammoniakproduksie tot gevolg het, is ook 'n waarskynlikheid. Dit is egter meer opvallend dat verhoogde ammoniakvlakke gepaardgaan met defekte van die vertakte-ketting-aminosuurmetabolisme soos in die geval van bogenoemde defekte. Vertakte-ketting-aminosure word in 'n groot mate in spiere afgebreek en speel 'n rol by die verwydering van aminogroepe in die vorm van alanien deur die glukose-alaniensiklus. Indien die katabolisme van die aminosure dus gerem word, mag die verwydering van

ammoniak uit die spiere vertraag word met 'n gevolglike verhoging van ammoniak (Mienie 1994). Indien die eersgenoemde moontlike verklaring 'n rol speel in die verhoging van ammoniak by die defekte mag dit daartoe bydra dat ammoniak by die pasiënte verhoog sonder dat dit gepaard gaan met verhoogde orotiensuurkonsentrasies. 'n Verhoging van ammoniak as gevolg verhoogde proteïenkatabolisme of verlaagde glukose-alaniensiklus mag met verhoogde orotiensuur gepaard gaan wat vir die studie van belang kan wees. Ander organiese-suurieë wat soms met verhoogde ammoniakvlakke gepaard gaan sluit in 3-ketothiolase defek, 3-hidroksi-3-metielglutariel-KoA-sintase defek, 3-metielglutakonsuururie en 3-hidroksi-isobottersuururie.

2.4.4 Pirovaatkarboksilase defekte

Defekete wat pirovaatkarboksilase aktiwiteit verlaag soos byvoorbeeld pirovaatkarboksilasedefek, biotinidasedefek en holokarboksilasesintasedefek word dikwels ook met verhoogde ammoniakvlakke geassoieer. Verlaagde pirovaatkarboksilase aktiwiteit lei tot verlaagde oksaalasynsuur wat tydens die tweede transaminasereaksie vir die vorming van aspartiensuur noodsaaklik is. Tydens hierdie defekte kan normale eerste transaminase van aminosure plaasvind met 2-ketoglutaarsuur as ontvanger van die aminogroepe. In 'n opvolgende transaminasereaksieword die aminogroepe vanaf glutamiensuur na oksaalasynsuur oorgedra. In die afwesigheid van pirovaatkarboksilase is oksaalasynsuur egter verlaag. Gevolglik hoop glutamiensuur op en aspartiensuur wat noodsaaklik is vir die ureumsiklus, se reaksies kan nie gevorm word nie. Sitrullien verhoog dikwels tydens die defekte en gevolglik kan verwag word dat karbamoïelfosfaat en dus orotiensuur ook sal ophoop.

2.4.5 Defekte in die β -oksidasie van vetsure en ander defekte wat energieproduksie beperk: (bv. medium-ketting asiel-KoA dehidrogenase defek).

Al is hiperammonemie 'n algemene verskynsel by die vetsuuroksidasiedefekte, is dit nie die hoof biochemiese kenmerk nie. Soos in die geval van die defekte van die vertakte-ketting-aminosuurmetabolisme kan 'n verhoogde proteïenafbraak hier ook 'n bydrae lewer en welke geval orotiensuur wel behoort te verhoog. Hierdie defekte sluit in defekte van die vetsuurtransport waaronder ook die karnitienmetabolise defekte en 'n menige aantal defekte van β -oksidasie waaronder die belangrike mediumkettingasiel-KoA-dehidrogenase (MCAD) defek wat met wiegiedood geassosieer word.

Ander defekte wat energieproduksie vanaf koolhidrate raak soos familiële fruktosemie en selfs insulienafhanklike defekte kan ook onder die groep geklassifiseer word. Defekte van die Kresiklus, pirovaatdehidrogenase reaksie, assemhalingsketting en oksidatiewe fosforilase defekte kan ook onder die groep geklassifiseer word.

2.4.6 Defekte wat tot lewerskade en gevolglik tot verhoogde ammoniak aanleiding gee.

Die ureumsiklus vind hoofsaaklik in die lewer plaas en gevolglik sal ammoniak verhoog indien lewerskade aangetref word. Bekende defekte wat tot lewerskade kan lei sluit aangebore metaboliese defekte soos klassieke en glikogeenstoringsdefekte en galsoutmetabolisme in. Dit is onbekend of die defekte wel tot verhoogde orotiensuur sal lei, aangesien die ammoniak nie noodwendig tot verhoogde karbamoiëlfosfaat sal lei nie. Die hoë voorkoms van die siektes soos in Suid-Afrika noodsaak egter dat die ondersoek in die studie ingesluit sal word.

2.4.7 Verhoging van orotiensuur as gevolg van ander metaboliese defekte as defekte wat met hiperammonemie gepaard gaan.

Verskeie defekte van die pirimidienanaboliese weg kan ook tot verhoogde orotiensuur aanleiding gee. Hierdie defekte sluit in fosforibosielpirofosfaat sintetase I defek, orotiensuururie Tipe I en Tipe II. Hierdie defekte sal dus nie gepaard gaan met verhoogde ammoniak nie.

2.5 METODES VIR DIE BEPALING VAN OROTIENSUUR

2.5.1 Inleiding

Uitskeiding van orotiensuur deur die niere is baie effektief en urinêre waardes korreleer met verandering in die metabolisme oor 'n tydperk. Om dié rede is dit meer relevant om orotiensuur in uriene te bepaal eerder as in plasma.

Die verspreiding van urinêre orotiensuurwaardes vir gesonde persone toon 'n assimetriese patroon met 'n gemiddelde waarde van 1.13 mmol/mol kreatinien en 0.62 mmol/mol kreatinien as die waarde wat mees algemeen voorkom (Asai et al. 2000:499). 'n Studie gedoen op enkel urienmonsters van 168 gesonde volwassenes in Nagoya Algemene Hospitaal (Japan) het referensiewaardes van 0,26 – 3,20 mmol/mol kreatinien opgelewer deur gebruik te maak van 'n HPLC metode (Sumi et al., 1997:195). Vrouens het hoër vlakke orotiensuur (0,36 – 3,20 mmol/mol kreatinien) as mans (0,26 – 1,91 mmol/mol kreatinien). Vlakke is ook hoër in babas tussen 1 - 12 maande (0,76 – 4,10 mmol/mol kreatinien) as in pasgebore babas, ouer kinders of volwassenes (Tabel 2.2) (Asai et al. 2000:499; Ohba et al., 1991:27).

Tabel 2.2 Referensiewaardes van orotiensuur in uriene

Ouderdom	n	Orotiensuur (mmol/mol kreatinien)	
		Gemiddeld	Greense
6 dae	25	1.77	1.13 - 2.46
6 maande	33	2.16	0.76 - 4.10
1 - 5 jaar	53	1.46	0.68 - 2.24
6 - 10 jaar	47	1.32	0.47 - 2.19
11 - 15 jaar	30	0.66	0.32 - 0.96
16 - 40 jaar	69	0.58	0.41 - 0.75
≥ 41 jaar	97	0.76	0.95 - 1.05

Aangepas vanuit Asai et al. (2000:499)

Die uitskeiding van orotiensuur is ongeveer helfte dié van normaal tydens vastende toestande as gevolg van 'n laer tempo van produksie en benutting. 'n Klein verhoging in urinêre orotiensuur is al waargeneem by verwagte vrouens (Wood, M.H., O'Sullivan, W.J., 1973:57) en vroegebore babas (Batshaw, M.L., Brusilow, S.W., 1978:221).

2.5.2 Analitiese metodes vir die bepaling van orotiensuur

Die eenvoudigste metode vir die bepaling van urinêre orotiensuur is die kolometriese metode gebaseer op die brominering en kleurontwikkeling met p-dimietielaminobensaldehyd (Tsuji, 1961; Adachi et al., 1963). Orotiensuur kan omgeskakel word na barbituursuur deur brominering en reduksie in die teenwoordigheid van asksorbiensuur. Barbituursuur word gebind met p-dimietielaminobensaldehyd en vorm 'n oranje produk 5-(p-dimietielaminobensilideen) barbituursuur, wat lig absorbeer by 480 nm (Roger, L.E., Porter, F.S., 1968:423). Die metode kan egter beïnvloed word deur 'n verskeidenheid verbindings (Harris, M., Oberholzer, V., 1980:473).

Slegs histidien het 'n noemenswaardige absorpsie by 480 nm by die konsentrasies wat in uriene voorkom. Sonder brominering produseer histidien geen kleur nie, dus kan nie-gebromineerde blanko's nie vir die inmenging van histidien korreger nie. Wanneer orotiensuur egter bepaal word vir die diagnose van aangebore orotiensuururie of om die

terapeutiese behandeling daarvan te monitor, sal die invloed van die verbindings nie 'n probleem wees nie omrede die konsentrasies in sulke gevalle baie hoog is. Indien die uriene vooraf chromatografies gesuiwer word, het die metode 'n goeie korrelasie met 'n HPLC metode. Beide orotiensuur en orotidien word gemeet tensy hierdie verbindings vooraf chromatografies geskei word.

Verskeie ander tegnieke is al gebruik om orotiensuur te bepaal. Die sensitiewe isotoop-verdunningsmetode (Lotz et al.; Tax et al., 1978; Jakobs et al., 1984), benodig groot volumes uriene met veelvuldige suiweringsstappe. Die metode van Christopherson en Finch (1977:159-167) sluit 'n soortgelyke isoleringsprosedure in, maar analitiese herwinning is laag. 'n Eenvoudige ensiematiese ultraviolet-spektrofotometriese metode is te onsensitief vir die bepaling van orotiensuur in normale uriene, as gevolg van die hoë blankowaardes wat behaal word met die metode (Rosenbloom, F.M., Seegmiller, J.E., 1964:492-500). Anioon uitruilingschromatografie gevolg deur ultraviolet spektrofotometrie is tydrowend en onsensitief (Fallon et al., 1961:1906-1914; Bellinger et al., 1971:1132-1133). HPLC metodes is meer sensitief en spesifiek, maar is baie arbeidsintensief wat monstervoorbereiding aan betref en benodig duur apparaat (Van Gennip et al., 1979:419-428).

Hoofstuk 3

MATERIALE EN METODEDES

3.1 KOLOMETRIESE BEPALING VAN OROTIENSUUR IN URIENE

3.1.1 Inleiding

Die eenvoudigste metode vir die bepaling van urinêre orotiensuur is die kolometriese metode gebasseer op die brominering en kleur ontwikkeling met p-dimetiëlamino-bensaldehid (Tsuji, 1961; Adachi *et al.*, 1963). Die metode berus op die beginsel dat orotiensuur met versadigde broomwater reageer om 5,5'-dibromobarbituursuur te vorm. Die verbinding word deur aksorbiensuur gereduseer tot barbituursuur. Barbituursuur reageer met p-dimetiëlamino-bensaldehid (Ehrlich se Reagens), en vorm 'n geel/oranje produk 5-(p-dimetiëlamino-bensilideen) barbituursuur, met 'n maksimum optiese digtheid by 480 nm (Roger, L.E. en Porter, F.S., 1968:423). Suiwer orotiensuur, wat bogenoemde reaksie ondergaan het, produseer 'n optiese digtheid by die golflengte proporsioneel aan die konsentrasie van die orotiensuur.

3.1.2 Instrumentasie, materiale en reagens

'n Libra S11 Sigbare lig Spetrofotometer (Biochrom Ltd., Cambridge, ENGLAND) is gebruik vir die analises.

Orotiensuur is aangekoop vanaf Sigma Chemical CO. Stokoplossings van 1 mmol orotiensuur in gedistilleerde water is voorberei. Die stokoplossing is gestoor by -17 °C en gebruik om standaard verdunnings (0.02, 0.04, 0.08 en 0.10 mmol) in gedistilleerde water voor te berei wat by 4 °C gestoor is. p-Dimetiëlamino-bensaldehid (p-DABA), 99 % suiwer, is aangekoop vanaf Sigma Chemical CO. Dertig g p-DABA is opgelos in 1 l propan-1-ol en gestoor by 4 °C in die donker, weg van direkte sonlig. Versadigde broomwater is voorberei vanaf broom (vloeibare vorm,

MERCK); gestoor in damp kas. L-Aksorbiensuur (MERCK), 50 g/L in water, 5 N HCl en 0.2 M sitraatbuffer, pH 2.5 is gestoor by 4 °C.

3.1.3 Metode 1 (Rogers en Porter 1968:423-428)

Een (1.0) ml uriene of 1.0 ml van elk van 'n standaard konsentrasiereeks orotiensuur (0.02, 0.04, 0.08 en 0.10 mmol) is aangesuur na pH 2-3 met 5-10 μ l 5 N HCl en oorgedra na 'n 10 ml glasbuis. Twee (2) ml 0.2 M sitraatbuffer is by die 1.0 ml monster gevoeg. Die blanko bestaan uit 3.0 ml 0.2 M sitraatbuffer en is dieselfde behandel as die monsters. 'n Half (0.5) ml versadigde broomwater is by die monsters gevoeg. Na 5 minute is 5 % aksorbiensuur in water by die monsters gevoeg. Na 'n verdere 5 minute is 2 ml 2.5 % p-dimetielaminobensaldehid in propan-1-ol bygevoeg. Die inhoud van die buise is na elke byvoeging deeglik geskud en toegelaat om by kamertemperatuur, weg van direkte sonlig, te staan. Die oranje kleur van die toetsreaksie is na 60 - 70 minute by 480 nm gelees. Die konsentrasie orotiensuur in elke monster is vanaf die standaardkurwe bereken.

3.1.4 Metode 2 (Duran 1985)

Die tweede metode wat in die studie gebruik is vir die bepaling van orotiensuur is ontvang van Dr M Duran, Kinder Wihelmina Ziekenhuis, Utrecht, Nederland. Hierdie metode het slegs in 2 opsigte verskil van die eerste metode wat in die studie gebruik is. Na die byvoeging van die sitraatbuffer en broomwater is die reaksiemengsel vir 5 minute by 40°C verhit. Na die verhittingsstap is die reaksiemengsel afgekoel voor die byvoeging van dimetielbensaldehid. Na die byvoeging van dimetielbensaldehid is die reaksiemengsel weer eens by 40°C verhit vir 10 minute en die finale produk is met 4 ml butielasetaat geëkstraheer. Die geëkstraheerde produk se absorpsie is met behulp van 'n fotometer by 458 nm bepaal.

3.2 ORGANIESE-SUURANALISE

Organiese sure is geëkstraheer en geanaliseer as TMS-esters en esters met behulp van GC-MS soos beskryf deur Mienie (1994). Die identifisering van die organiese sure is geverifieer met gaschromatografie-massaspektrometrie (GC-MS). 'n Hewlett Packard 5973 kwadрупool massaspektrometer toegerus met 'n Hewlett Packard 6890 GC is gebruik. Die GC was toegerus met 'n SE30 kapillêre kolom (Permabond® Fused Silica kapillêre kolom (25m x 0.32 mm, 0.25 µm),. Draergas, helium, teen 'n vloeitempo 2 ml per minuut is gebruik as draergas. Temperatuur:progam by 'n aanvangstemperatuur van 70 °C (2 minute) begin en 'n temperatuur toename van 5 °C per minuut tot 280 °C is gebruik. Die ionbron se temperatuur was 220 °C en elektronionisasie is by 70eV uitgevoer.

3.3 MONOSAKKARIEDANALISES

Sifting vir defekte van die monosakkariedmetabolisme is uitgevoer deur middel van bepaling van reduserende substansie (Clinitest, Ames CO) soos beskryf deur Shih *et al.*, 1991:51-52. Positiewe resultate is opgevolg deur een dimensionele dunlaag chromatografie volgens die metode beskryf deur Shih *et al.*, 1991:69-75.

3.4 OLIGOSAKKARIEDANALISES

Daar bestaan nie 'n siftingstoets vir defekte van die oligosakkariedmetabolisme nie. Die kliniese beeld van growwe gelaatstrekke is egter opvallend by die defekte en is altyd opgevolg deur oligosakkariedanalises. Oliogosakkariede is geanaliseer volgens die metode soos beskryf deur Scwell 1991:205-218.

3.5 MUKOPOLISAKKARIEDANALISES

Sifting vir defekte van die mukopolisakkarieddefekte is uitgevoer deur middel van die Alcian blou-metode. Positiewe resultate is opgevolg deur elektroforese analises van die mukopolisakkariede soos beskryf deur Debure en Roesel 1991: 77-81.

3.6 AMINOSUURANALISES

Verskeie tegnieke vir die opsporing van aangebore defekte van die aminosuurmetabolisme is aangewend. Ferriehloriedtoets (fenielalanien), α -nitroso- β -naftoltoets (tirosien), sianiednitroprussiedtoets (swael bevattende aminosure) en een dimensionele dunlaagchromatografie is aangewend soos beskryf deur Shih *et al.*, 1991:69-75 en Bremer *et al.*, 1981: 425-445. Defekte is opgevolg deur GC-MS analises met behulp van die EZ:faast metode.

3.7 ASIELKARNITIENANALISES

Asielkarnitienanalises is uitgevoer met behulp van tandem massaspektrometrie volgens Muellera *et al.*, 2003:47.

3.8 BAIE-LANGKETTING-VETSUURANALISES

Baie-langketting-vetsuuranalises is uitgevoer deur middel van GC-MS analises soos beskryf deur Vreken *et al.*, 1998:282

3.9 HOË-DRUK VLOEISTOFCHROMATOGRAFIE

3.9.1 Inleiding

Anders as die bogenoemde tegnieke was met die aanvang van die studie nog nie 'n metode vir die analyses van puriene en pirimidine in die laboratorium bekikbaar nie. Om die rede moes die tegniek gestandaardiseer word. Die tegniek was ook belangrik vir die verfiëring van die orotiensuurkonsentrasies. Tradisioneel word HPLC vir die tipe analyses gebruik. Die tegniek is eerstens aangewend. Met die aankoop van 'n kapillêre elektroforese apparaat is die tegniek later in die studie aangewend en analyses van vorige pasiënte wat slegs met behulp van die tegniek geanaliseer was, is herhaal.

3.9.2 Materiaal, reagentie en instrumentasie

Beckman System Gold HPLC sisteem wat bestaan uit 'n tweevoudige-pomp programmeerbare oplosmiddel module (programmeerbare oplosmiddel module 126) en 'n detektor met die vermoë om te kan skandeer (skandeer detektor module 168). Beide die pompe en die detektor was onder die beheer van 'n mikro-rekenaar wat toegerus is met 'n System Gold sagteware program. Die HPLC is toegerus met 'n kolom van Phenomex. Die kolom (250 x 4.00 mm) is gepak met Lichrosphere 5 RP Select B, 5 mikron pakkingsmateriaal.

Die oorspronklike metode het kaliumfosfaatbuffers bevat. Met die oog op moontlike HPLC-MS analyses is die kaliumfosfaat met ammoniumasetaat vervang. Die metode wat hier beskryf word, sal dus beskryf word as kaliumfosfaat of ammoniumasetaat.

Twintig (20) mmol kaliumfosfaatbuffer (Sigma) of ammoniumasetaatbuffer (Sigma) (pH 5), wat vir verdunning van urienmonsters gebruik is, is in gedistilleerde water opgemaak. 'n Stokoplossings (10 mmol) van elk van die volgende standaarde: orotiensuur, uridien, inosien, guanosien, uriensuur, 2-deoksi-adenosien, hipoxantien, xantien, timien, adenien,

guanien, sitosien en urasil is opgemaak.. Allopurinol (10 mmol) is opgemaak en gebruik as interne standaard.

Die HPLC elueringsbuffers het uit vier elueringsvloei-stowwe bestaan en al die buffers is gefiltreer deur 'n 0.2 μm Millipore filter. 'n Twintig (20) mmol kaliumfosfaat of ammoniumasetaatbuffer (A1), 'n kaliumfosfaat of ammoniumasetaat/ metanolbuffer (B1), metanol (B2) en water (A2). Vir die kaliumfosfaat of ammoniumasetaat/metanol buffers is 'n 40 mM kaliumfosfaat of ammoniumasetaatoplossing (pH 8.75). Die filtraat is dan gemeng op 'n 1:1 (v/v) met HPLC graad metanol om 'n finale kaliumfosfaat of ammoniumasetaat konsentrasie van 20 mM.

Die volgende gradiënt is gebruik:

100% A1 (0 min-19 min) waarna die konsentrasie van buffer B1 toeneem na 20 % na 24 minute van die begin van die analise. Hierdie konsentrasie word konstant gehou vir die opvolgende 5 minute en daarna neem dit toe tot 100% B1 neem binne die opvolgende 5 minute (34 minute na die aanvang van die analise) toe tot 100%. B1 word teen 100% gebruik vir die volgende 5 minute waarna die persentasie B2 verhoog word totdat B2 100% bereik op 43 minute na die aanvang van die analise. B2 word daarna teen 100% aangewend tot 49 minute na die aanvang van die analise. Oor die opvolgende 9 minute word B2 vervang met A2 totdat 'n finale % van 100% bereik word. Die opname van data word gestaak as die persentasie van A2 begin toeneem. A2 is dus slegs vir regenerering aangewend. Na die regenerering van die kolom is daar weer teruggeskakel na die fosfaatbuffer.

3.9.3 Voorbereiding van urienmonsters

Urienmonsters is verdun met buffer sodat hul kreatinien waardes gelykstaande is aan 0,8 mM, 'n vasgestelde hoeveelheid interne standaard (Allopurinol) is by die monster gevoeg sodat die finale

konsentrasie van die interne standaard 200 mmol/mol kreatinien was. In gevalle waar 'n urienmonster se kreatinien waarde minder as 0,8 mM was, is die 'n konstante hoeveelheid interne standaard (Allopurinol) bygevoeg en die pH ingestel na 5 met die minimum HCl of NaOH. Dit sal 'n baie geringe verdunning van die monster tot gevolg hê, maar aangesien slegs 20 μ L van die interne standaard (van 'n 10 mM stokoplossing) by 1 ml uriene gevoeg is, en die minimum HCl of NaOH gebruik is, kan die verdunningseffek baie klein geïgnoreer word.

3.10 KAPILLÊRE ELEKTROFORESE

3.10.1 Reagense

Alle reagense was analitiese graad. Boorsuur en natriumhidroksied is aangekoop vanaf Merck. Base en nukleosiede is aangekoop vanaf Sigma. Gedeïoniseerde water (18MV/cm) was gebruik vir die voorbereiding van al die oplossings.

3.10.2 Kapillêre elektroforese apparaat en kondisies

Alle analyses is uitgevoer op 'n Agilent G1600AX kapillêre elektroforese apparaat. Elektroforese skeiding is uitgevoer op skoon silika kapillêr (75 μ m i.d., X 375 μ m o.d. van Polymicro Technologies). Die kapillêr het 'n effektiewe lengte van 40 cm en 'n totale lengte van 47 cm gehad. Analises is by 15 kV by 35°C uitgevoer. Ultravioletdeteksie is gebruik by 190-300 nm. Die data tempo was 2 Hz. Die monster lading het plaasgevind by lae druk (0,5 psi) vir 'n tyd van 5 sekondes. Boraatbuffers (60mmol/L) is voorberei vanaf boorsuur en SDS (tot 'n finale konsentrasie van 80 mmol/L) is bygevoeg. Die oplossing se pH is ingestel op pH 9,6 met behulp van 500g/L NaOH. Aan die begin van elke werksdag is die kapillêr gewas met water gevolg deur 0,1 mol/L NaOH, water en skeidingsbuffer vir 5 minute onderskeidelik. Tussen analises is die kapillêr gewas met 0,1 mol/L NaOH vir 0,5 minute en skeidingsbuffer vir 1

minuut. Van die belangrikste diagnostiese metaboliëte vir purien en pirimidien metaboliëse defekte is opgelos tot 'n konsentrasie van 600 $\mu\text{mol/L}$ in gedeïoniseerde water. Die standaard is verdun (1:1) met 'n buffer wat 2X die konsentrasie van die skeidingsbuffer bevat het. Alle urine is voor analise op dieselfde wyse verdun. Die karakteristieke van die geanaliseerde metaboliëte word in Tabel 3.10.1 weergegee. Die effektiewe mobiliteit van die standaard is bereken soos voorgeskryf deur die verskaffers.

Tabel 3.10.1. *Karateristieke van purien, pirimidien en ander UV-absorberende verbindings.*

Effektiewe mobiliteit , $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ z V}^{-1} \text{ z s}^{-1}$	Metaboliëte	Absorpsie maksima, nm
0,0	Ureum	205
-3,3	Kreatinien	234
-9,3	Karnosien	234
-10,2	Timien	263
-10,6	Allopurinol	253
-11,6	Adenien	260
-15,1	Urasil	259
-17,9	Tirosien	250
-18,0	Guanien	246, 272
-18,2	Adenosien	259
-18,6	Sitidien	269
-19,2	Fenielalanien	220
-21,5	Hipoxantien	254
-23,0	Argininosuksiensuur	220
-23,0	Guanosien	252
-23,5	Arginien	218
-25,4	Uridien	262
-25,6	Hippuursuur	225
-26,0	Pseudouridien	274
-27,0	Inosien	250
-28,0	Uriensuur	235, 290
-28,2	Oksipurinol	241
-28,6	Xantien	240, 275
-29,4	5-Oksoprolien	223
-36,4	Orotiensuur	280

Verskeidenheid van die belangrikste vereistes wat aan analises in 'n roetine laboratorium vir diagnostiese doeleindes gestel word, is met dié

tegniek aan voldoen. Die analisetyd was kort, onderhoudkoste laag en die herhaalbaarheid baie goed. Verdere standaardisering van die tegniek sal in Hoofstuk 4 bespreek word.

3.11 ALLOPURINOL BELADINGSTOETS

3.11.1 Inleiding

Die akkumulering van groot hoeveelhede karbamielfosfaat in die mitochondria (soos wat voorkom in ornitien karbamieltransferase-defektiewe hemisigote of heterosigote na 'n proteïen inname) lei tot die diffusie daarvan na die sitoplasma, waar dit pirimidien biosintese stimuleer. Pirimidien biosintese is egter ook verhoog in hepatosiete van asimptomatiese ornitienkarbamieltransferase-defektiewe heterosigote met geen oënskynlike biochemiese of kliniese abnormaliteite nie. Die inhibisie van orotidien monofosfaat (OMP) dekarboksilase deur oksipurinol ribonukleotied (die reaksie produk van allopurinol in vivo) lei tot 'n opeenhoping van OMP, dit lei tot die akkumulering van orotidien en orotiensuur en uiteindelik orotidienurie en orotiensuururie. Die mate van orotidienurie en orotiensuururie kan dan gebruik word om ornitien karbamieltransferase-defektiewe heterosigote te onderskei van normale vrouens.

3.11.2 Metode

Allopurinolbelading is gedoen op familieledes van die geaffekteerde pasiënt asook vier kontrole persone. In die geval van vrouens, moet die toets gedoen word 7 - 10 dae na aanvang van die menstruele siklus. Nadat 'n persoon wakker geword het in die oggend, is 'n urienmonster geneem (eerste uriene van die dag). 'n Enkele dosis Allopurinol (300 mg vir volwassenes en 100 mg vir kinders onder tien, uitsluitend babas onder die ouderdom van 4 jaar) word saam met ontbyt, wat 'n proteïen bevat, geneem.

Urienmonsters is dan geneem oor 'n tydperk van 24 uur in tydsintervalle van 6 ure.. Elke urienmonster is in 'n afsonderlike houer opgevang en gevries.

Alle persone wat die toets ondergaan het, is gevra om hul vloeistofinname te beperk tot 1 liter gedurende die 24 uur toetsperiode en om nie verversings wat alkohol, kaffeïene of bensoaat bevat, te drink nie.

Die totale orotiensuurinhoud (orotiensuur en orotidien) in al die urienmonsters is bepaal met die kolometriese metode. Organiese suuranalises is op al die urienmonsters gedoen volgens die standaard-oplosmiddelekstraksiemetode.

Hoofstuk 4

RESULTATE

4.1 INLEIDING

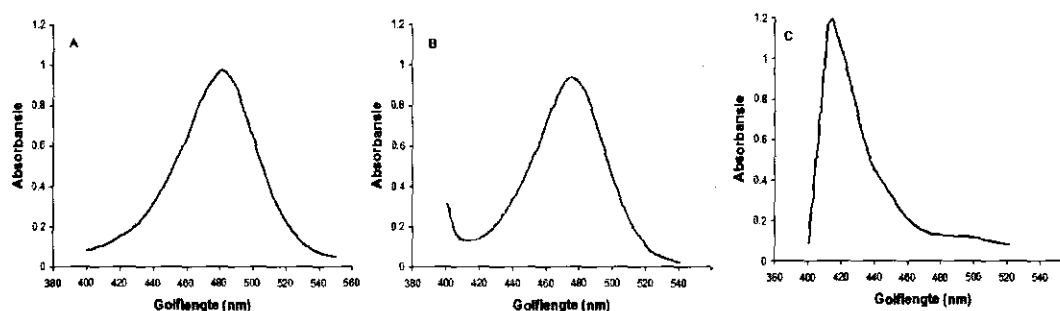
Metaboliese siftingstoetse soos die ferriechoried- en Benedict toets word algemeen as siftingsmetode vir aangebore metaboliese defekte van die fenielalanienmetabolisme en koolhidraatmetabolisme gebruik. In die opsig kan die uitskeiding van orotiensuur as 'n siftingsmetode ook nuttig aangewend word vir 'n verskeidenheid defekte. Orotiensuur verhoog in die uriene en bloed van pasiënte met orotiensuururie, maar is ook abnormaal verhoog indien ammoniak verhoog. Ammoniak verhoog by 'n verskeidenheid defekte wat insluit ureumsiklus, aminosuur, koolhidraat en lipiedmetabolisme defekte. Indien orotiensuurbepaling aangewend kan word is dit potensiëel moontlik om 'n groot verskeidenheid defekte met die tegniek op te spoor. In die studie is gepoog om vas te stel watter defekte kan met die metode opgespoor word. Vir die doel is meer as 1200 pasiënte se orotiensuurkonsentrasies in uriene bepaal. Volledige diagnostiese analyses is vervolgens uitgevoer en 'n finale diagnose is verkry. Die uitskeiding van orotiensuur deur pasiënte met abnormaliteite is vergelyk met pasiënte waarby geen abnormaliteite verkry is nie. Op die wyse is bepaal wat die tipiese uitskeidingskonsentrasies van verskillende defekte is en 'n protokol word voorgestel

4.2 STANDARDISERING VAN DIE KOLOMETRIESE METODE VIR DIE BEPALING VAN OROTIENSUUR

Twee metodes was beskikbaar vir die kolometriese bepaling van orotiensuur (Duran 1985 en Rogers en Porter 1968:423-428). Hoewel die twee metodes nie dramaties verskil nie, verg die metode van Duran (1985) 'n ekstraksiestap met behulp van butielasetaat. Die ekstraksie

verg langer voorbereidingstyd vir die analise en butielasetaat het 'n uiters onaangename reuk. Indien die metode nie duidelike voordele wat die kwaliteit van die resulate betref, toon nie sal die metode van Rogers en Porter (1968:423-428) eerder in die studie gebruik word.

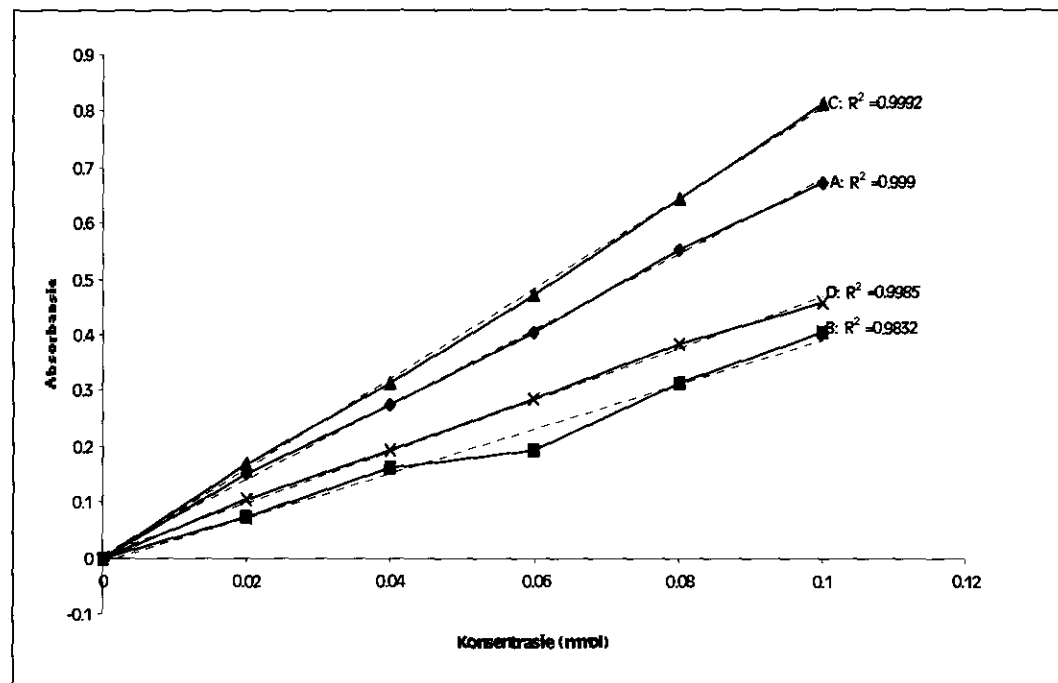
'n Standaardkonsentrasiereeks van orotiensuur (0.02, 0.04, 0.08 en 0.10 mmol) in onderskeidelik water en normale uriene is opgemaak en geanaliseer volgens die metodes soos beskryf deur Duran (1985) en volgens die metode soos beskryf deur Rogers en Porter (1968:423-428). Een (1.0) ml van elk van 'n standaard konsentrasie reeks orotiensuur in afsonderlike 10 ml glasbuis het dieselfde kleurreaksie (Hoofstuk 3) as die urienmonsters ondergaan. Die absorpsiespektra van die standaard in water, standaard in uriene en normale uriene en word in Figuur 4.2.1a, b en c vertoon.



Figuur 4.2.1 (a) Absorpsie spektrum van orotiensuur standaard opgemaak in water, (b) opgemaak in uriene en (c) normale urienmonster. (Metode volgens Rogers en Porter (1968:423-428))

Die standaard absorpsie spektra van die orotiensuur kleurreaksie vertoon 'n maksimum absorpsie by 480 nm met min invloed van die voorkoms van normale verbindings wat in uriene teenwoordig is. Dit is egter bekend dat ander verbindings soos histidien ook 'n kleurkompleks met die beskryfde reaksie vertoon daarom is dit noodsaaklik dat 'n gevorderde analitiese prosedure ontwikkel moes word om die teenwoordigheid van orotiensuur te bevestig. Hierdie metodes en resultate sal later bespreek word.

Die absorpsie van die afsonderlike standaardkonsentrasies (in water en urine soos beskryf) is by 480 nm of 458 nm (afhangend van die metode wat gebruik is) gelees en is gebruik om 'n standaardkurwe op te stel (Figuur 4.2.2).



Figuur 4.2.2 Vergelyking tussen die metode volgens Duran (1985) en die metode aangepas vanuit Rogers en Porter (1968:423-428). (A): Standaardreeks in water volgens Duran (1985) (B): Standaardreeks in urine volgens Duran (1985) (C): Standaardreeks in water volgens metode aangepas vanuit Rogers en Porter (1968). (D): Standaardreeks in urine volgens metode aangepas vanuit Rogers en Porter (1968)

Die resultate toon dat beide die metodes beïnvloed word deur die teenwoordigheid van urinêre verbindings (Tabel 4.2.1). Die metode van Rogers en Porter (1968:423-428) het egter beter resultate gelewer wat sensitiwiteit betref en is om die rede in die studie gebruik.

Tabel 4.2.1 *Persentasie herwinning soos behaal met onderskeidelik die metode volgens Duran et al en die aangepaste metode vanuit Rogers en Porter (1968).*

Konsentrasie (mmol)	Konsentrasiereeks in uriene	
	Duran 1985	Rogers en Porter
0.02	54 %	68 %
0.04	47 %	73 %
0.06	44 %	67 %
0.08	39 %	63 %
0.1	52 %	58 %

Die effek van verskillende uriemosters op die meting van die orotiensuurkonsentrasies is nagegaan deur 'n groot aantal analyses soortgelyk as bo beskryf uit te voer. Die invloed wat die urine op die meting van orotiensuur het blyk nie 'n konstante faktor te wees nie en kan daar dus nie vir die blussing gekorrigeer word nie. Sommige analyses het selfs 'n hoër waarde getoon as die verwagte waarde wat moontlik aan kleurreaksies van ander metaboliete toegeskryf kan word. Om die rede is die standaardkurwe soos verkry in water gebruik vir kwantifisering. Hoewel dit reeds duidelik is dat die reaksie nie kan lei tot absolute akkurate bepalinge nie, kan die metode steeds goed aangewend word as 'n siftingsmetode indien al die limiete van die metode bekend is. Verhoogde waardes word verwag tydens defekte van die pirimidienmetabolisme sowel as enige defek wat ammoniak vlakke verhoog. Laasgenoemde kom voor by defekte van die ureumsiklus, organiese suururieë, aminosuururieë en defekte wat tot erge lewer beskadiging aanleiding gee. Hierdie defekte sluit veral defekte soos galaktosemie, fruktosurie en tirosienemie in.

Soos in die literatuur bevind is kan orotiensuur bykans by enige defek potensiëel verhoog. Vir die studie moes dus metodes aangewend word wat die volledige spektrum defekte potensiëel kan identifiseer en 'n metode moes verkry word wat orotiensuur akuraat kan kwantifiseer om sodoende die siftingsmetode te evalueer. Aminosuur-, koolhidraat- en organiese suuranalitiese metodes word reeds vir baie jare in die

Laboratorium vir Aangebore Metaboliese Defekte te Potchefstroom gebruik en is om die rede nie nodig gewees om te standaardiseer nie. Pirimidiene is egter nog nie voorheen roetine in die laboratorium uitgevoer nie en hierdie metode was ook belangrik vir die verifiëring van die voorkoms van orotiensuur en moes dus gestandaardiseer word.

4.3 STANDAARDISERING VAN PURIEN-PIRIMIDIEN-ANALISES

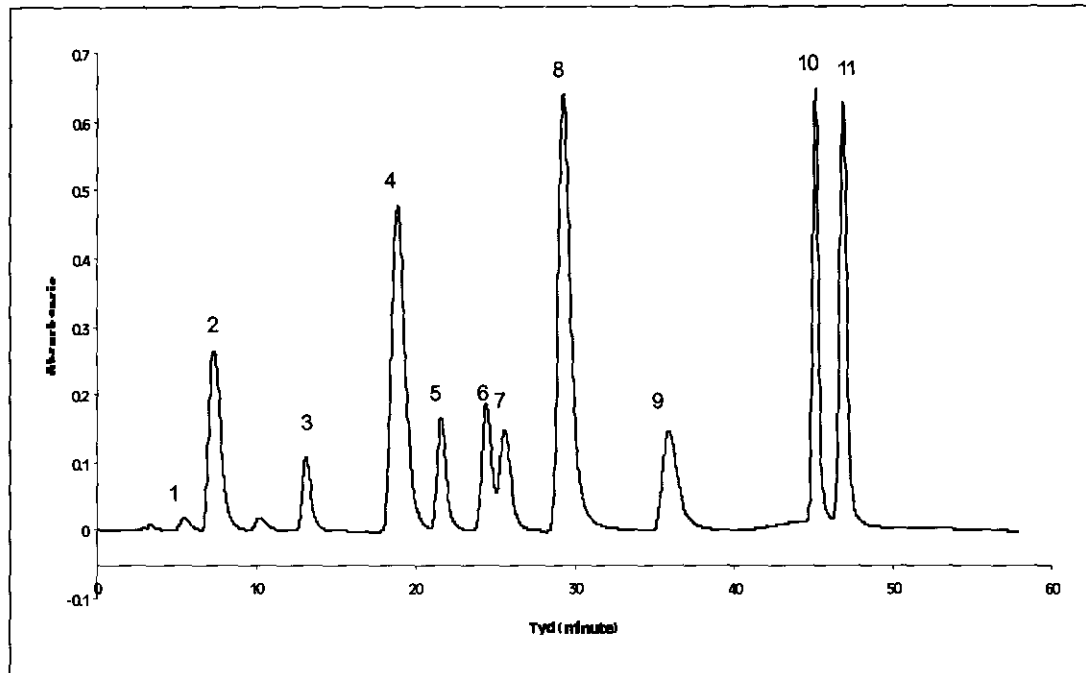
Twee metodes word tradisioneel vir purien-pirimienanalises gebruik nl HPLC en meer onlangs tandem massaspektrometrie. 'n Derde metode kan potensieel aangewend word, naamlik kapillêre elektroforese. Laasgenoemde is tot op hede slegs eksperimenteel aangewend en sover vasgestel kan word, word die apparaat nog nie in roetinelaboratoriums vir die doel gebruik nie. Die eenvoudige aard van die tegniek en die lae onderhoudkoste maak die tegnieke egter ideaal vir 'n roetine laboratorium vir die opsporing van metaboliese defekte. In die studie word juis gepoog om die analitiese benadering veral gesien in die lig van die Suid-Afrikaanse omstandighede te vereenvoudig en om die rede is daar gepoog om die tegniek vir die doel aan te wend.

4.3.1 Standardisering van HPLC metode vir purien-pirimidienanalises

Rivera *et al.*, (1991:11-14) beskryf 'n metode waarin 'n tweedelige-buffersisteem gebruik is. Die kolom word eers geëluëer met 'n fosfaatbuffer (0.02 M KH₂PO₄) by pH 5 ± 0.01 . Die tweede buffer het 'n fosfaatbasis (0.02 M KH₂PO₄, pH 8.75 ± 0.01) in 'n 1:1 oplossing met metanol. Die analitiese kolom gebruik is 'n 250 x 4.0 mm kolom gepak met Lichrosphere 60 RP Select B, 5 µM .

Die metode soos beskryf deur Rivera *et al.*, (1991:11-14) is gebruik in 'n eerste poging om twaalf standaarde van mekaar te skei. Die profiel van die skeiding word in Figuur 4.3.1(a) weergegee. Die skeiding van die standaarde was bevredigend maar aangesien verwag kan word dat

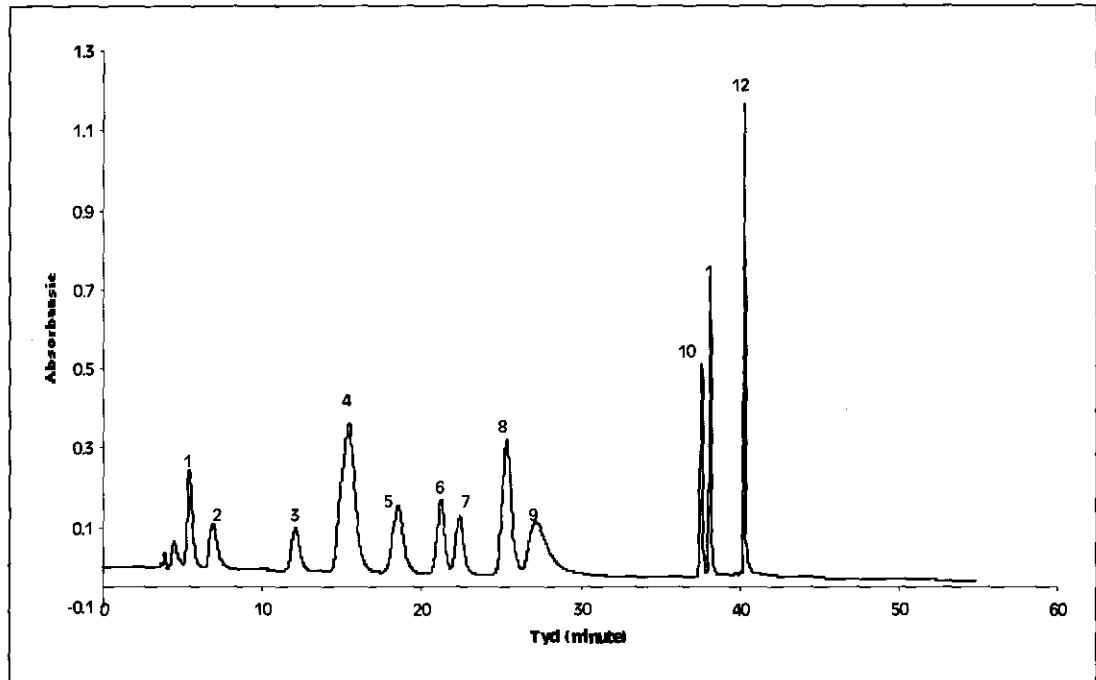
massa spektrometrie soms aangewend sal moet word vir identifisering van onbekende verbindings is na metodes gekyk wat ammoniumasetaat as buffer bevat. Laasgenoemde buffer lewer beter resultate indien LC-MS aangewend word.



Figuur 4.3.1(a) Profiel van die skeiding van 12 standaarde. 1: Sitosien; 2: Orotiensuur; 3: Uriensuur; 4: Hipoxantien + Guanien; 5: Xantien; 6: Uridien; 7: Timien; 8: IS (Allopurinol); 9: Adenien; 10: Inosien; 11: Guanosien Kondisies soos beskryf deur Rivera et al. (1991:11-14).

Die 20 mM fosfaatbuffer is met 'n 20 mM ammoniumasetaatbuffer (pH5) vervang en die metode is uitgevoer soos beskryf in Hoofstuk 3 en as onderskrif by Figuur 4.3.1(b) Die vervanging van die fosfaatbuffersisteem met 'n ammoniumasetaatbuffersisteem het nie 'n groot invloed op die skeiding van die purien- en pirimidienmetaboliete gehad nie. Slegs 'n geringe invloed is op die retensietye van die onderskeie standaarde waargeneem, maar die volgorde van die eluering van die verbindings het nie verander nie. Figuur 4.3.2(b) toon die resultaat wat behaal is. Die afsonderlike standaarde in die monster is geïdentifiseer op grond van hul onderskeie UV absorpsiespektra maar die moontlikheid vir die gebruik van massaspektrometrie was nou daar. Enkele probleme is reeds ondervind.

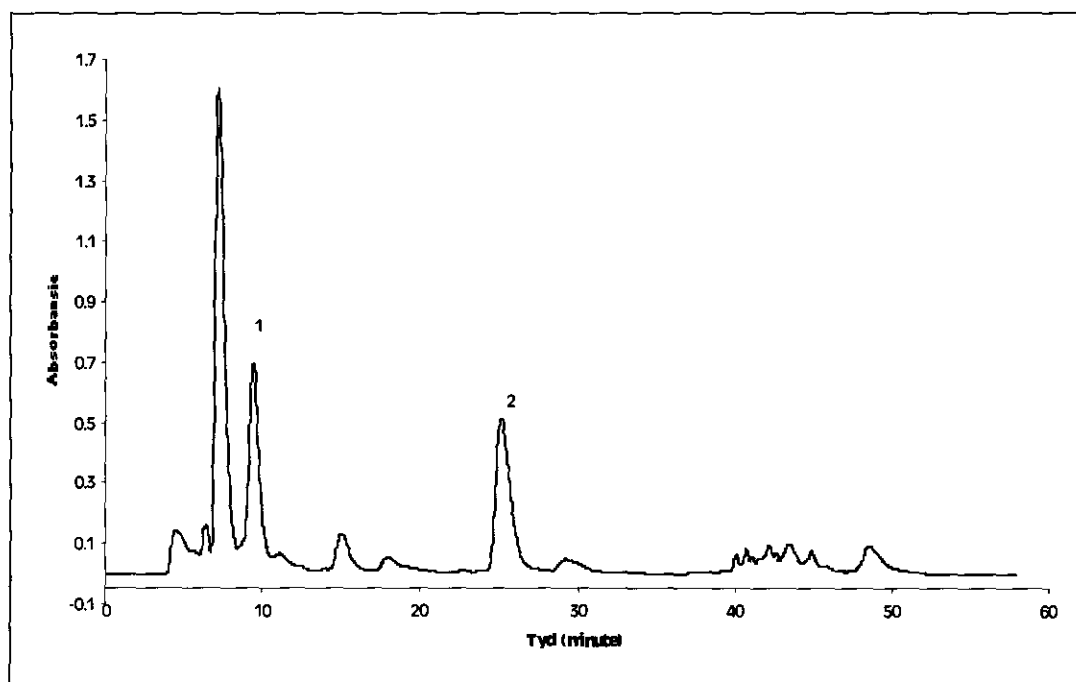
Hipoxantien en guanien ko-elueer, maar aangesien die defekte wat tot verhoogde hipozantien en guanien aanleiding gee gewoonlik beide verhoog en dit nie met verhoogde orotiensuur gepaard gaan nie is dit nie as 'n groot probleem beskou nie.



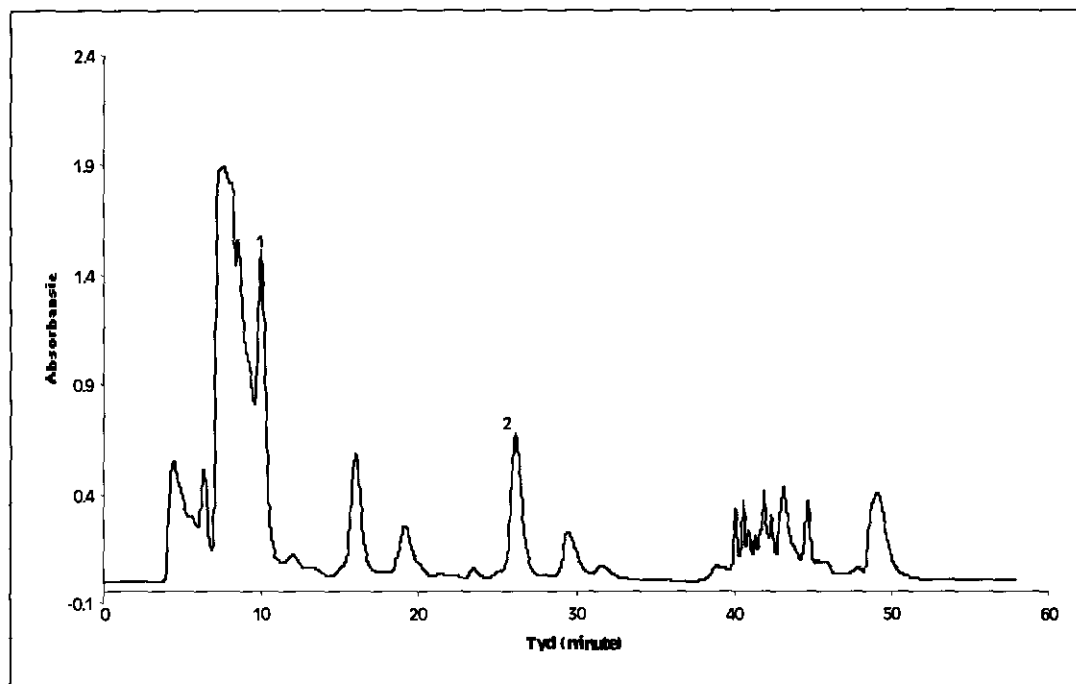
Figuur 4.3.1(b) Profiel van die skeiding van twaalf standaarde. 1: Sitosien; 2: Orotiensuur; 3: Uriensuur; 4: Hipoxantien + Guanien; 5: Xantien; 6: Uridien; 7: Timien; 8: Interne Standaard (Allopurinol); 9: Adenien; 10: Inosien; 11: Guanosen; 12: 2-Deoksi-adenosen
 Kondisies gebruik in die skeiding
 Buffer "B1" : 20 % vanaf 24 - 29 minute; 100 - 0 % by 34 minute
 Buffer "A2" : 0 % vanaf 0 - 34 minute; 100 % by 34 minute
 Buffer "B2" : 0 % vanaf 0 - 39 minute; 100 % vanaf 43 - 49 minute; 0 % by 58 minute.

Hoewel standaardanalises met behulp van die metode bevredigende resultate gelewer het, het analyses van urinêre puriene en pirimidiene minder bevredigende resultate opgelewer. Analises van 'n normale urienmonster het 'n piek vertoon op die posisie van orotiensuur waarvan die absorpsie spektrum verskil het van die van orotiensuur (Figuur 4.3.1(c)). Om dit te ondersoek, is 'n bepaalde konsentrasie orotiensuur opgemaak in 'n normale urienmonster van 'n kontrole persoon en geanaliseer deur van die metode gebruik te maak (Figuur 4.3.1(d)). 'n

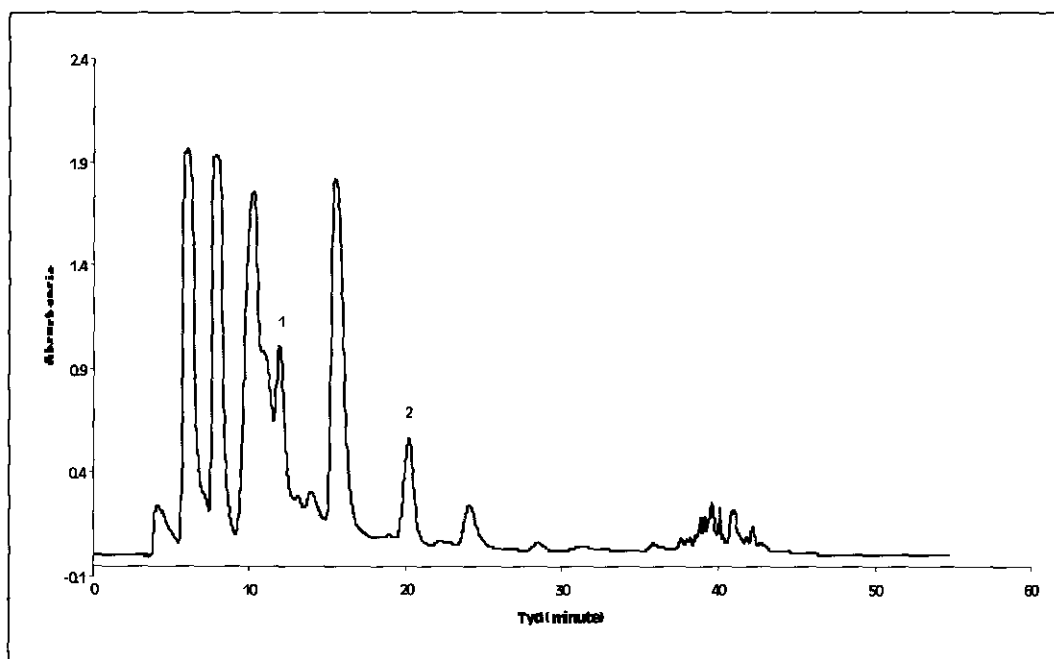
Urienmonster van 'n pasiënt met verhoogde orotiensuur vlakke volgens die kolometriese metode is ook op die metode geanaliseer (Figuur 4.3.5). Al die resulate het 'n onaanvaarbare skeiding van orotiensuur met 'n ander verbinding wat later as urasil geïdentifiseer is aangetoon. Met die toevoeging van urasil tot die standaard mengsel is bevind dat orotiensuur en urasil nie met behulp van die metode geskei kon word nie (Figuur 4.3.1(f)).



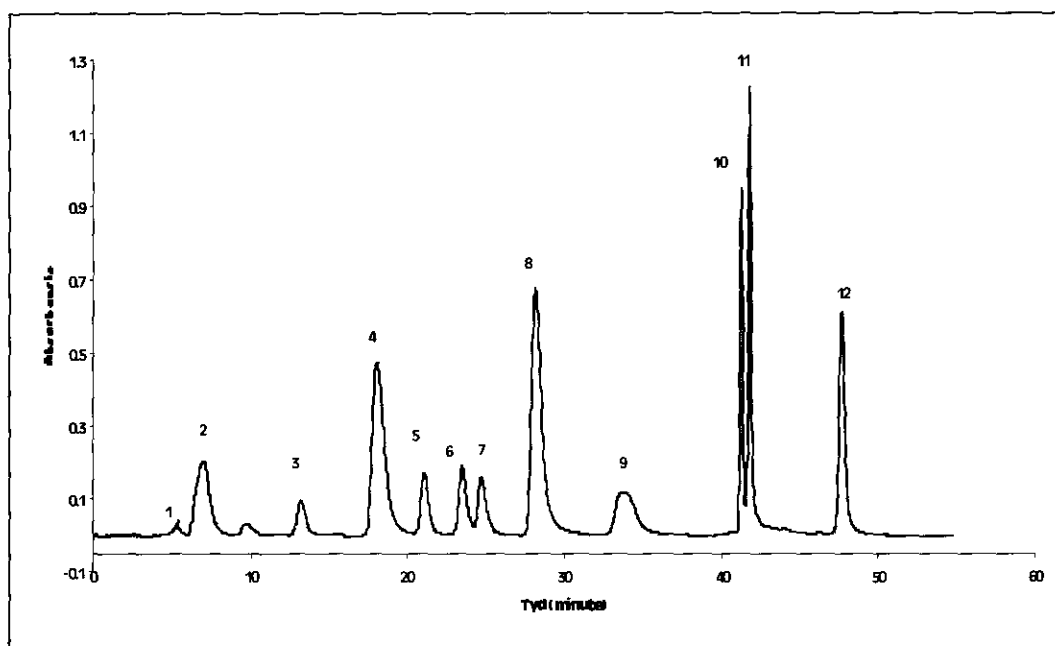
Figuur 4.3.1(c) Profiel van 'n kontrole urienmonster. 1: Uriensuur; 2: IS (Allopurinol)



Figuur 4.3.1(d) Profiel van 'n urienmonster met 200 μmol orotiensuur. 1: Uriensuur; 2: IS (Allopurinol)



Figuur 4.3.1(e) Profiel van 'n urienmonster vanaf 'n pasiënt met hoë konsentrasies orotiensuur. 1: Uriensuur; 2: IS (Allopurinol)



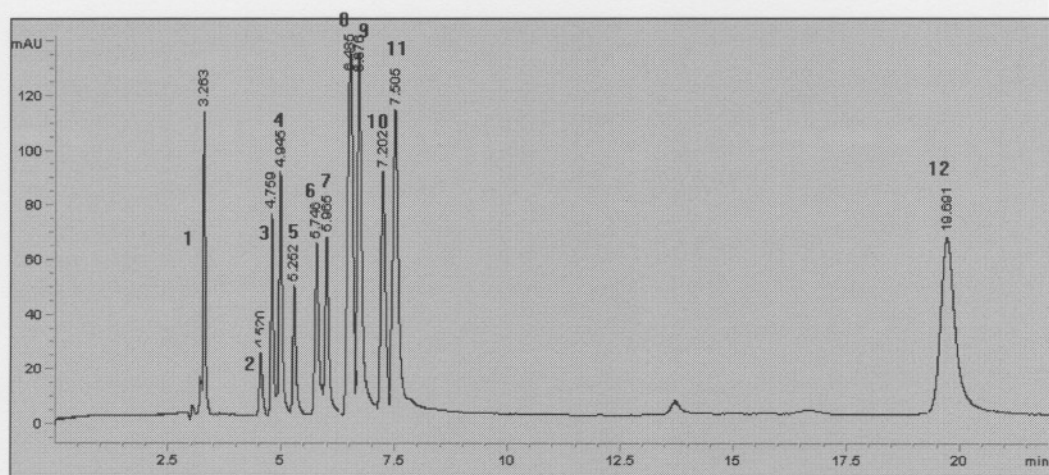
Figuur 4.3.1(f) Profiel van die skeiding van 13 standaarde 1: Sitosien; 2: Orotiensuur + Urasil; 3: Uriensuur; 4: Hipoxantien + Guanien; 5: Xantien; 6: Uridien; 7: Timien; 8: IS (Allopurinol); 9: Adenien; 10: Inosien; 11: Guanosien; 12: 2-Deoksi-adenosien

Verskeie ander probleme is ook ervaar met die metode. Die analisetyd was onaanvaarbaar lank. Die analisetyd van 60 minute moes opgevolg word met lang regenereringstyd met metanol en die eerste buffer. Indien die regenereringstyd verkort word is die resulate nie herhaalbaar nie en 'n groot variasie in retensietye is opgemerk. In die studie word die kwantitatiewe waarde vir orotiensuur benodig. Indien die tegniek in die algemeen vir diagnostiese doeleindes aangewend word kan dit moontlik aangewend word, maar vir die studie sal die invloed van die teenwoordigheid van urasil die gebruik daarvan beperk. Die teenwoordigheid van proteiene en moontlik ander partikels het die kolom verstopt en veroorsaak dat die elueermiddel druk onaanvaarbaar hoog gestyg het. Dit het gelei tot lang tye waaraan onderhoud bestee moes word wat onaanvaarbaar vir 'n roetinelaboratorium is.

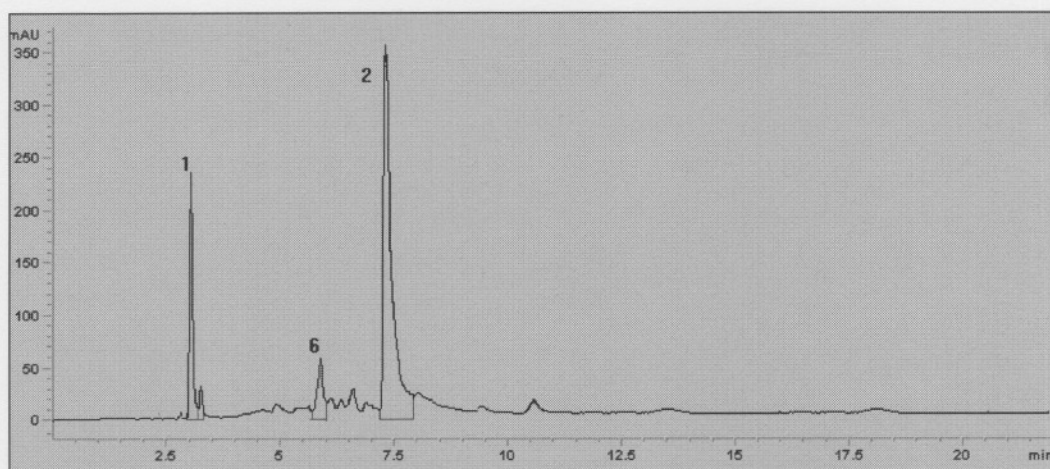
Hoewel massaspektrometrie aangewend kon word vir die identifikasie van selfs verbindings wat ko-elueer sal dit nie die analise tyd verkort nie en is die metode steeds onaanvaarbaar.

4.3.2 Kapillêre elektroforese analyses van puriene en pirimidiene

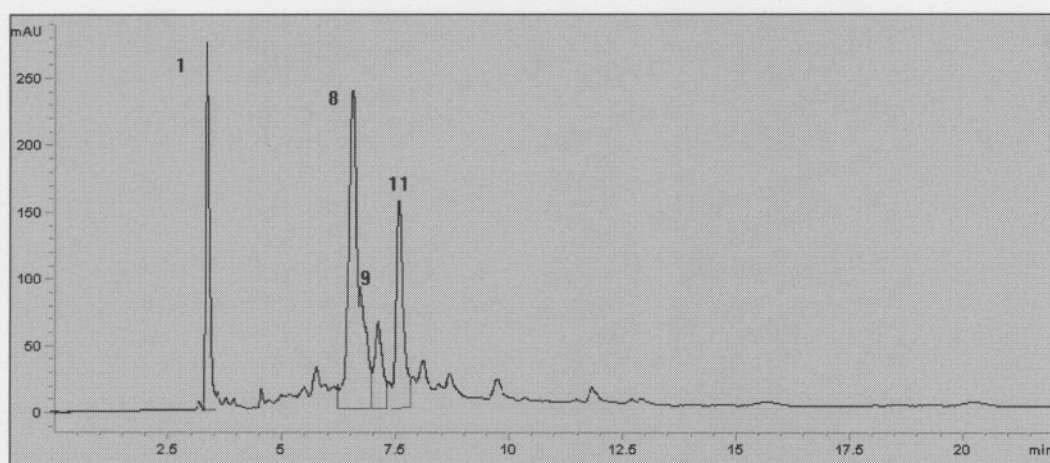
Uitstekende skeiding is behaal met behulp van kapillêre elektroforese (Figuur 4.3.2(a)). Met die tegniek kon orotiesuur totaal van die ander pirimidiene en puriene geskei word. Die analisetijd was kort en die herhaalbaarheid uitstekend. Die analiese koste was minimaal wat die tegniek uitstekend geskik vir roetine analiese maak. Urinêre purien- en pirimidienanaliese is uitgevoer op urine van pasiënte met 'n verskeidenheid defekte van die purien- en pirimidienmetabolisme en word in Figure 4.3.2(a) tot 4.3.2 (f) weergegee.



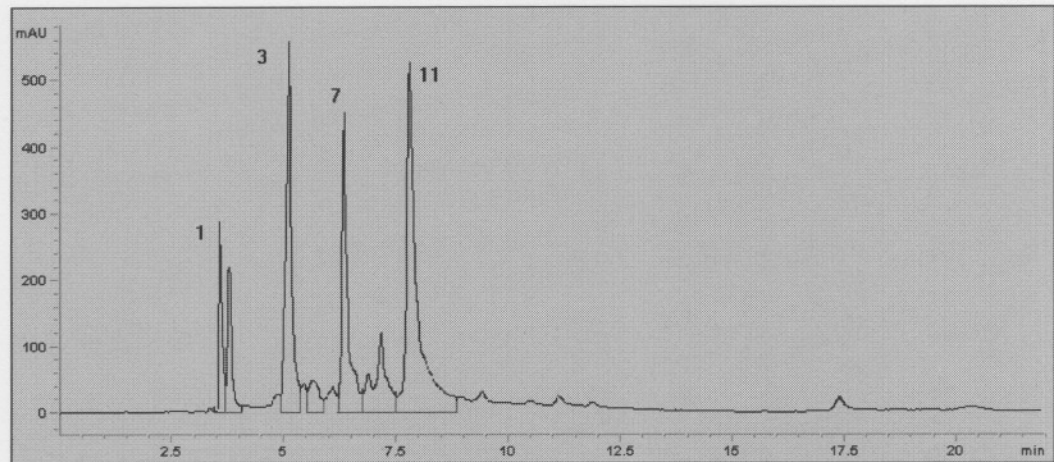
Figuur 4.3.2(a) Elektroferogram van purien en pirimidien standaarde (1) Kreatinien (2) Karnosien (3) Timien (4) Adenien (5) Guanien (6) Hippiursuur (7) Urasil (8) Hipoxantien (9) Xantien (10) Inosien (11) Uriensuur (12) Orotiesuur.



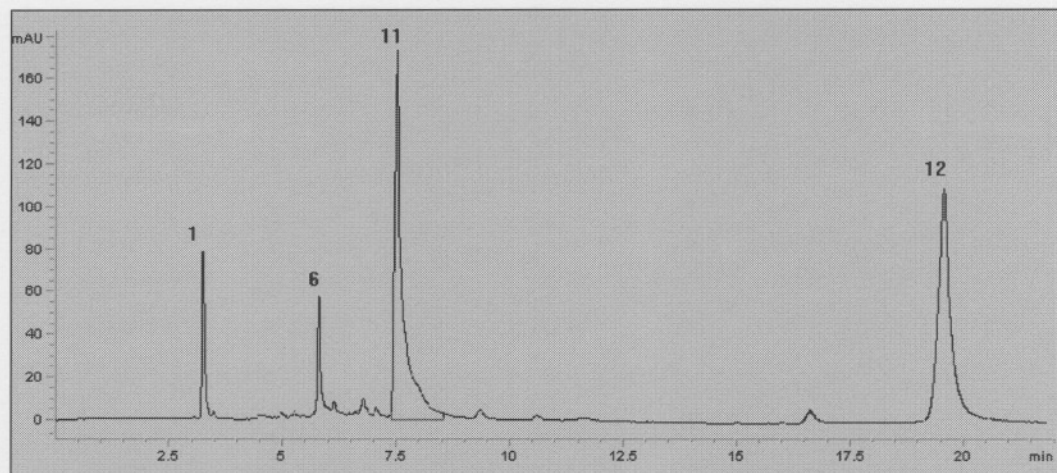
Figuur 4.3.2(b) Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in normale uriene (vir identifikasie sien Figuur 4.3.2(a))



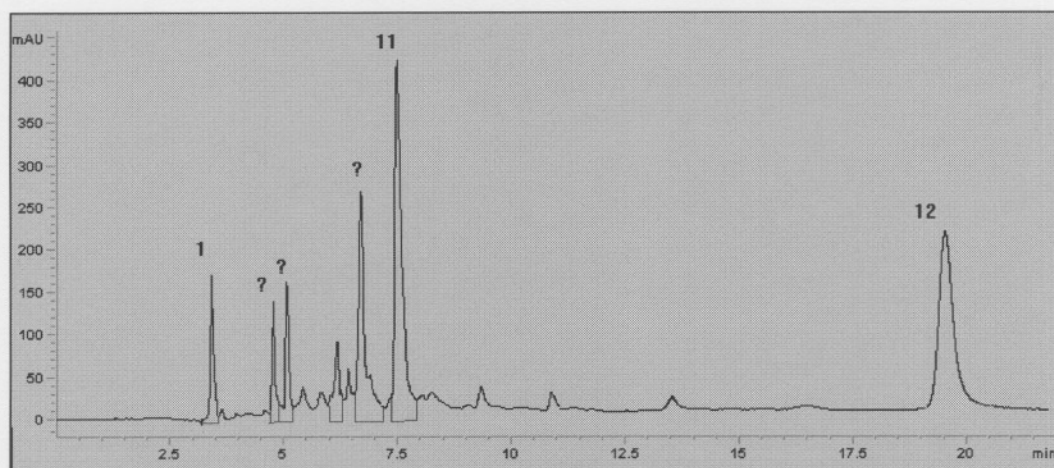
Figuur 4.3.2(c) Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in uriene van 'n pasiënt met xantienoksidase defek (vir identifikasie sien Figuur 4.3.2(a))



Figuur 4.3.2(d) Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in uriene van 'n pasiënt met dihidropirimidiendehidrogenase defek (vir identifikasie sien Figuur 4.3.2(a))



Figuur 4.3.2(e) Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in uriene van 'n pasiënt met orotiensuururie (vir identifikasie sien Figuur 4.3.2(a))



Figuur 4.3.2(f) Elektroferogram van puriene en pirimidiene teenwoordig in uriëne van 'n pasiënt met OTC defek (vir identifikasie sien Figuur 4.3.2(a))

Die liniêriteit van orotiënsuur (5-500 $\mu\text{mol/L}$) vir die analise was 0,9958. Die detekselimiete by 'n sein tot geraas verhouding van 3 was egter nie baie goed nie. Konsentrasies minder as 15 mmol/mol kreatinien was nie opspoorbaar met behulp van die analise nie. Om die rede kon die tegniek nie aangwend word om die normale vlakke van orotiënsuur te meet nie. Vir roetine analises van defekte van purien en pirimidienanalises was die tegniek egter uitstekend geskik en word tans roetine matig gebruik. Die gebruik van 'n interne standaard was nie nodig nie aangesien kreatinien opspoorbaar is met behulp van die tegniek. Voor die analises word kreatinien kolometries bepaal en kan dus die funksie van die interne standaard vervang omrede die konsentrasie bekend is.

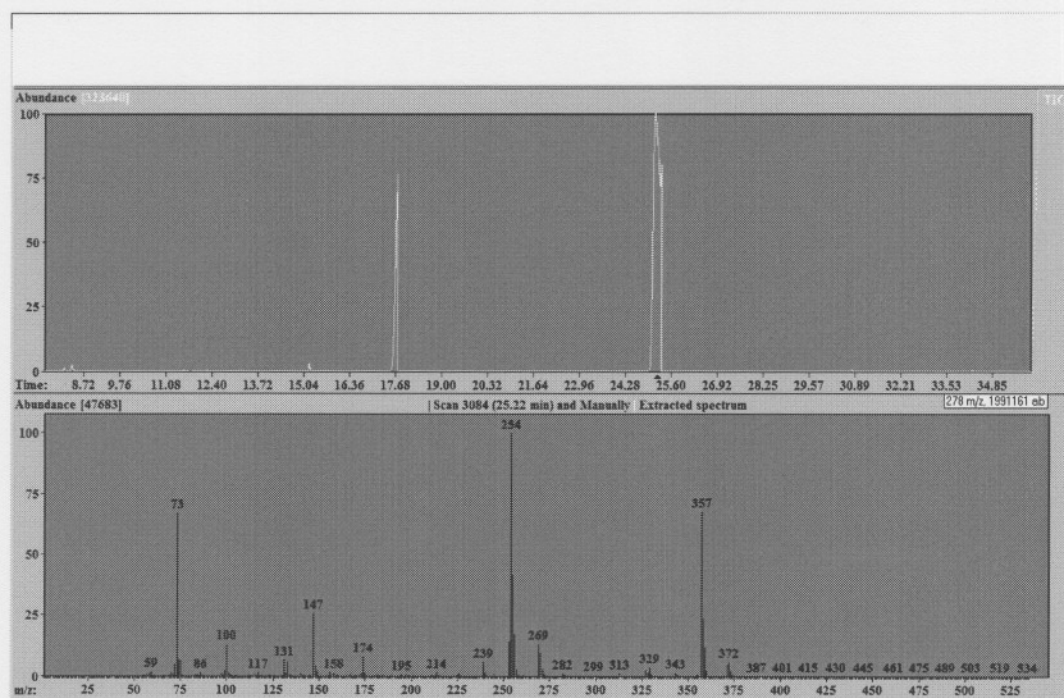
4.3.3 GC-MS analises van puriene en pirimidiene

Dit is bekend dat sommige pirimidiene tydens organiese suuranalises waargeneem word. Indien die pirimidiene met behulp van die metode gekwantifiseer kan word sal dit geweldig tyd bespaar aangesien organiese suuranalises bykans deurgaans op alle verwysde materiaal uitgevoer word. Om die moontlikheid te ondersoek is organiese suuranalises op alle diagnostiese purien- en pirimidienstandaarde uitgevoer. Die deteksie

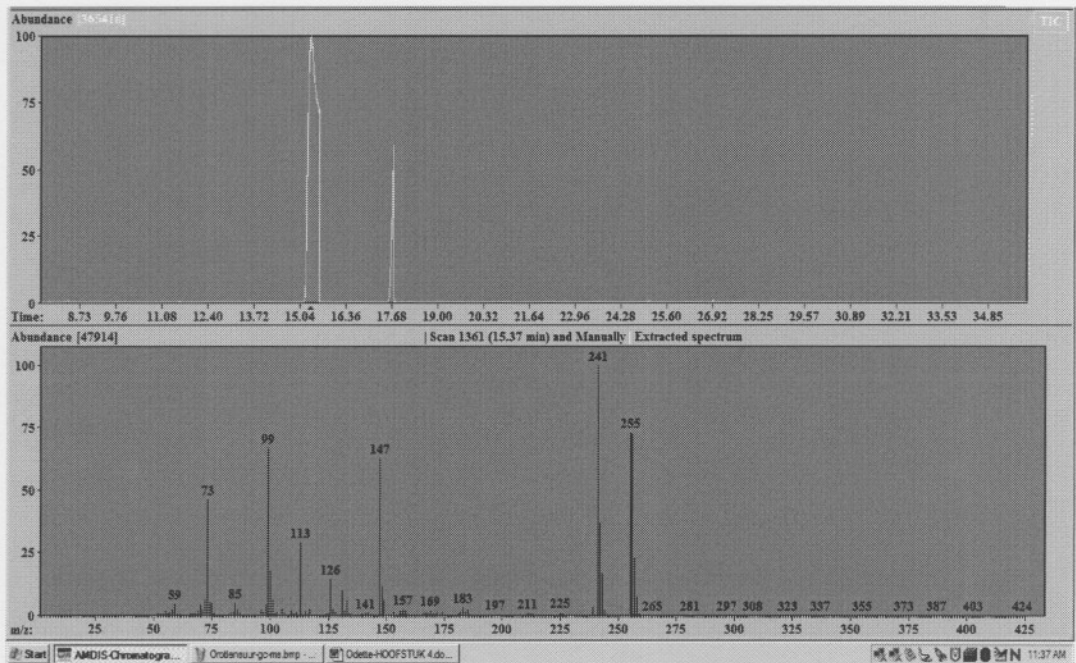
vermoë van die tegniek ten opsigte van die puriene was baie swak en kon slegs opgespoor word as die standaard teen hoë konsentrasies teenwoordig was. Die pirimidienstandaarde het egter baie bevredigende resultate gelewer. Veral orotiensuur, urasil en timien het goed kwantitatief geëkstraheer (Figuur 4.3.3 a tot c). Die detekselimiet van die drie pirimidiene was ongeveer 8 mmol/mol kreatinien wat binne die gepubliseerde normaalwaardes van ten minste orotiensuur was.

Daar was dus verskeie voordele om die tegniek in die studie te gebruik ten spyte van die goeie resultate wat met kapillêre elektroforese verkry is. Laasgenoemde tegniek sal egter gebruik word indien daar aanduidings van 'n purienmetaboliese defek is.

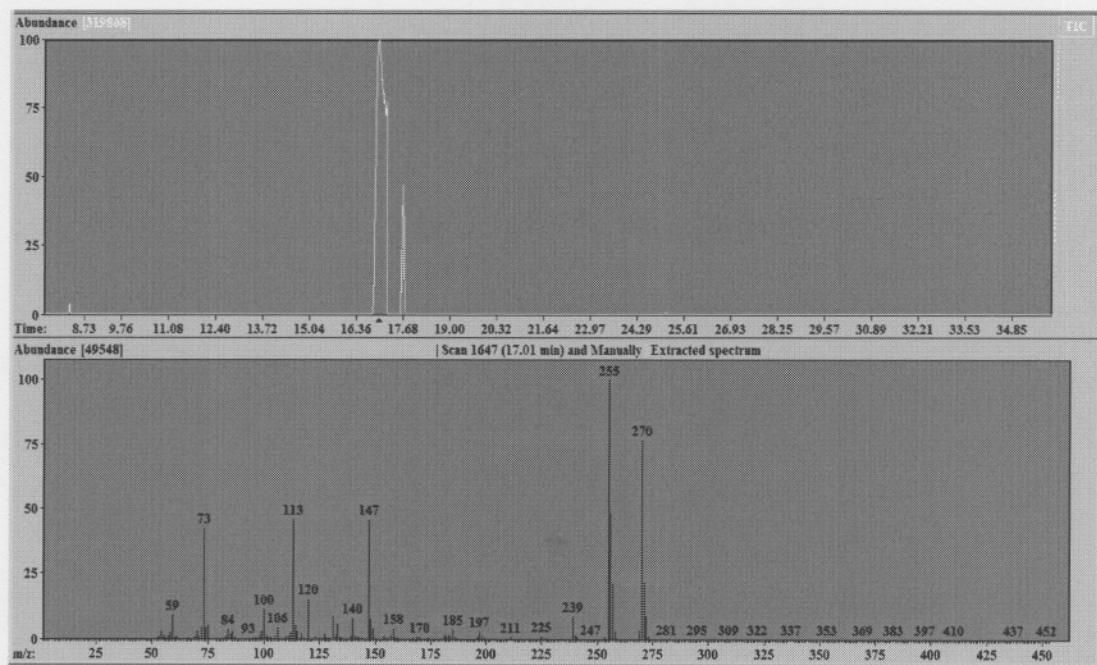
Responsfaktorwaardes vir bogenoemde drie pirimidienmetaboliete is bepaal en is deurgaans gebruik in die kwantifisering van die metaboliete.



Figuur 4.3.3(a) Totale ionprofiel en elektronionisasie massaspektrum van orotiensuur.



Figuur 4.3.3(b) Totale ionprofiel en elektronionisatie massaspektrum van urasil.



Figuur 4.3.3(c) Totale ionprofiel en elektronionisatie massaspektrum van timien.

Die liniêriteit van orotiensuur (5-500 $\mu\text{mol/L}$) GC-MS was 0,9338 wat minder goed as vir kappilêre elektroforese was. Die deteksielimiëte by 'n sein tot geraas verhouding van 3 was egter beter. Konsentrasies van tot 9 mmol/mol kreatinien was opspoorbaar. Die hoër sensitiwiteit van die GC-MS analise en omrede die tegniek altyd op elke pasiënt se uriene uitgevoer word is besluit om die tegniek in die studie aan te wend om die konsentrasie van orotiensuur te kontroleer.

4.4 Standaardisering van siftingsmetode.

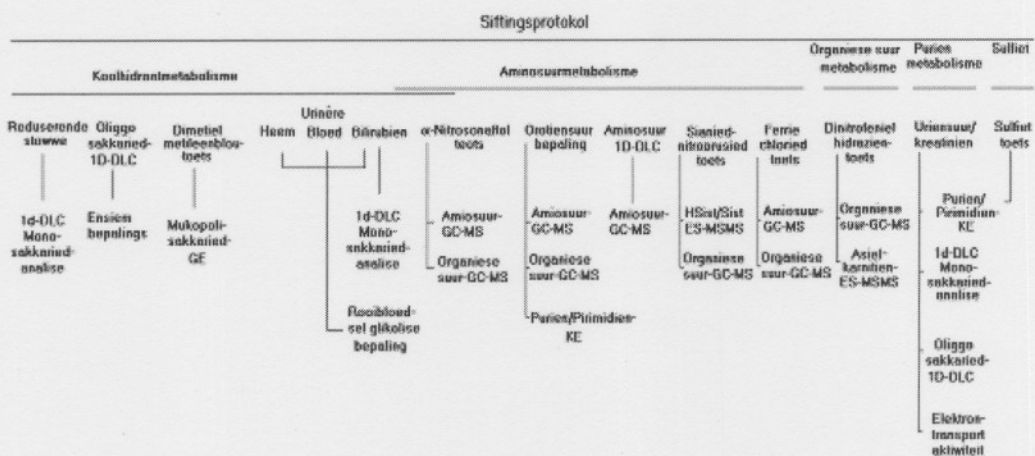
4.4.1 Benadering

Tradisioneel word die standaardisering van siftingsmetodes voorafgegaan deur die analyses van normale persone en die generering van verspreidingskurwes. In die geval van metaboliese defekte het die benadering egter sekere gebreke:

- In die geval van metaboliese defekte moet onderskei word tussen pasiënte wat siek is as gevolg van metaboliese defekte en nie-metaboliese oorsake. Die gebruik van normale gesonde kontroles is in die opsig dus nie korrek nie.
- Enige oorsaak van kliniese abormaliteit sal bydra tot verhoogde weefselafbraak of weiering van voedsel. Gevolglik kan verhoogde proteïenafbraak verwag word wat aanleiding kan gee tot verhoogde ammoniakvlakke en gevolglik verhoogde orotiensuurvlakke. Na verwagting sal die "normaalvlakke van orotiensuur" van 'n groep siek kinders reeds verskil van 'n groep klinies siek kinders.

Gevolglik was ons verplig om 'n ander benadering in die studie te volg. Meer as 1200 pasiënte is volledig ondersoek vir die voorkoms van metaboliese defekte deur die benadering wat in Figuur 4.4.1. voorgestel word te gebruik. Die pasiënte wat geen abormaliteite vertoon het nie is ingesluit as die kontrolegroep. Indien enige abormaliteit waargeneem is

of enige metaboliese defek opgespoor kon word, is die pasiënte verdeel op grond van die defek of metabolisme waarin die abnormaliteit voorgekom het. Die benadering wat gevolg is vir die verdeling sal later bespreek word. Die urinêre orotiensuurkonsentrasies en kreatinienkonsentrasies van die pasiënte is bepaal soos beskryf en die finale konsentrasies is bepaal as mmol orotiensuur/mol kreatinien.



Figuur 4.4.1. Voorstelling van die siftingsprotokol wat gevolg is vir die bepaling van die voorkoms van aangebore metaboliese defekte

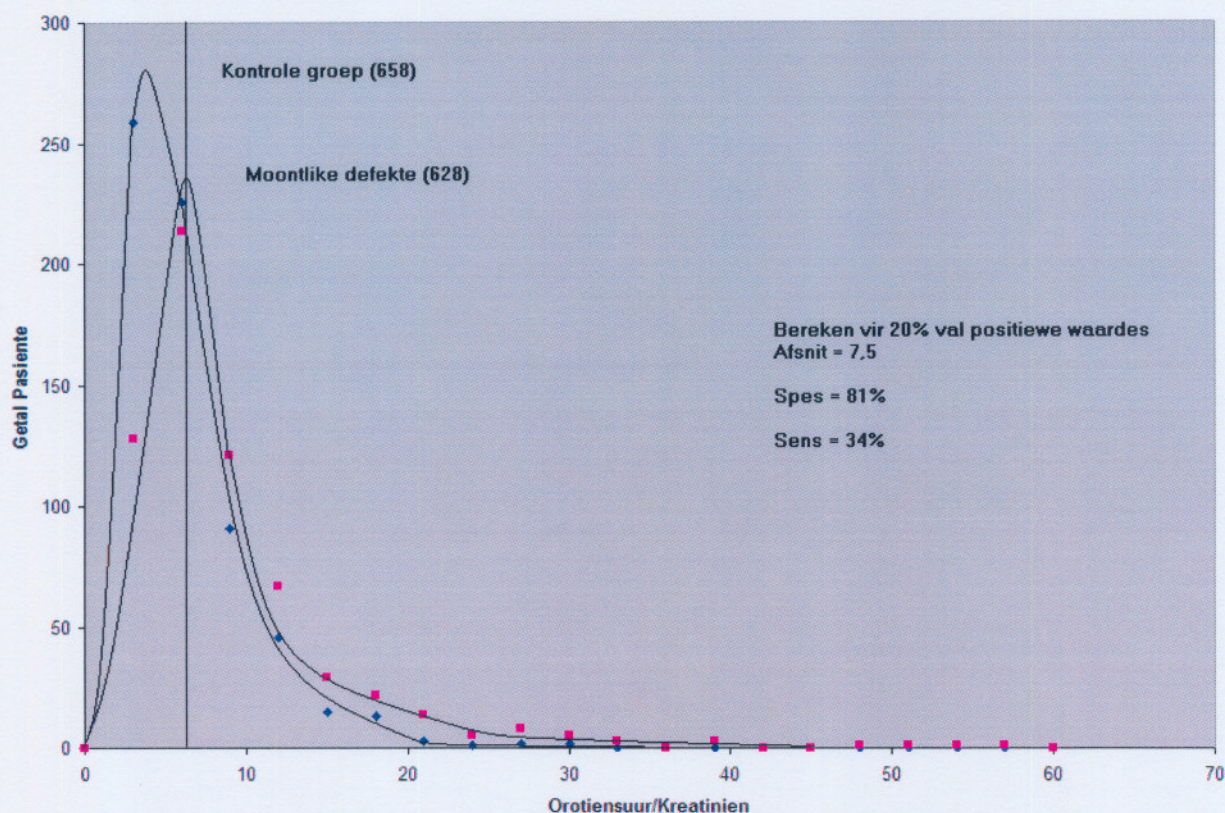
4.4.2 Bepaling van normaalkonsentrasies en verspreiding.

In die uriene van en 658 pasiënte kon geen abnormaliteite aangetoon word met die metodes soos voorgestel in Figuur 4.4.1 nie. Hierdie pasiënte is in die kontrolegroep ingesluit. Ses honderd agt en twintig pasiënte het 'n abnormaliteit vertoon hoewel al die pasiënte nie gediagnoseer kon word nie. Al die pasiënte is in 'n tweede groep ingedeel. Die verspreidingkurwe van die orotiensuur/kreatinien word in Figuur 4.4.2.1 vertoon. Vooraf is besluit dat 'n persentasie van 20% vals positiewe waardes aanvaarbaar sal wees vir die studie. Hierdie persentasie sal verskil van laboratorium tot laboratorium en is afhanklik van verskeie faktore wat in ag geneem moet word. Hierdie faktore sluit in: die beskikbaarheid van fondse, die hoeveelheid materiaal wat verwys word vir metaboliese ondersoeke en die gevolge van die defekte indien 'n

vals negatiewe waarde verkry word. Daar is geen duidelike riglyne in die literatuur watter persentasie vals positiewe of vals negatiewe waardes internasionaal aanvaarbaar is nie. Die persentasie van 20% vals positiewe waardes moet dus as 'n voorlopige aanvaarbare waarde gesien word, maar soos die studie vorder mag dit aangepas word. Die berekende gemiddelde waardes van die twee groep word in Tabel 4.4.2.1 weergegee

Tabel 4.4.2 Berekende gemiddelde waardes van pasiënte gebruik in die studie

	Kontrolegroep	Orotiensuur	Groep met abnormaliteite	Orotiensuur
	Ouderdom (Dae)		Ouderdom (Dae)	
Gemiddeld	3089.897	4.863103	2099.057	8.725637
Std-Afwyking		3.946664		20.37885
Maksimum	22631	28.05	25948	273.936
Minimum	1	0.108	1	0.012
Mediaan	1082	3.702	603.5	5.475



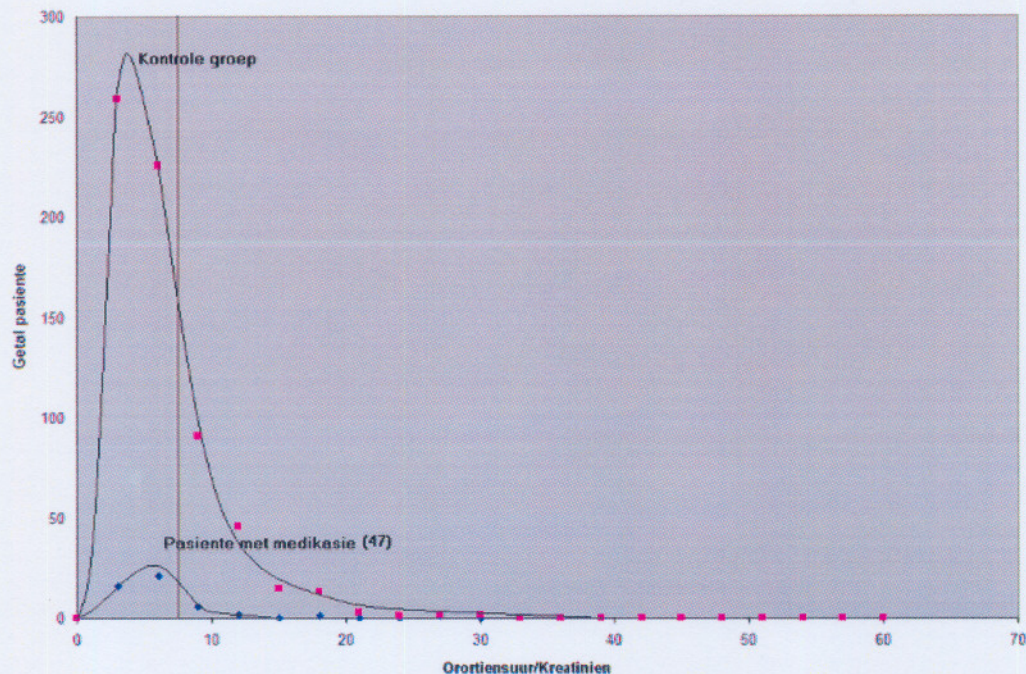
Figuur 4.4.2 Verspreidingskurwe van orotiensuur/kreatinien van 'n groep pasiënte wat geen abnormale urinêre metaboliëte vertoon het nie en 'n groep wat wel abnormale metaboliëte vertoon het.

Die effektiwiteit van die toets is bereken as 57,9 %. Die effektiwiteit is nie aanvaarbaar nie en verdere ondersoek moes gedoen word met die oog op moontlike verbetering veral van die sensitiwiteit. Verskeie faktore mag 'n invloed hê wat insluit.

- Die invloed van medikasie. Aangesien alle pasiënte wat abnormale verbindings in die uriene getoon het in die tweede groep ingesluit was bevat die groep pasiënte wat medikasie soos valproaat ontvang het ook in. Hoewel sommige van die pasiënte wel metaboliese defekte kan hê is dit nie noodwendig 'n aanduiding van 'n defek nie.
- Ouderdomsafhanklike uitskeiding: Ouderom mag moontlik 'n invloed op die uitskeiding van orotiensuur hê. Indien die pasiënte volgens ouderdom verdeel word mag 'n verbeterde sensitiwiteit verkry word.
- Geslagsafhanklike uitskeiding: Geslag mag moontlik ook 'n invloed hê en kan in berekening gebring word.

4.4.2.1 Invloed van medikasie op die uitskeiding van orotiensuur.

Valproaat, antibiotika en parasetamol is waarskynlik van die medikasie wat die meeste gebruik word in die groep pasiënte wat in die studie betrek is. Beide bogenoemde medikasie lewer identifiseerbare organiese sure en pasiënte wat dit ontvang het kan dus geïdentifiseer word. Die invloed wat die medikasie op die uitskeiding van orotiensuur het kan dus ondersoek word (Figuur 4.4.2.1).



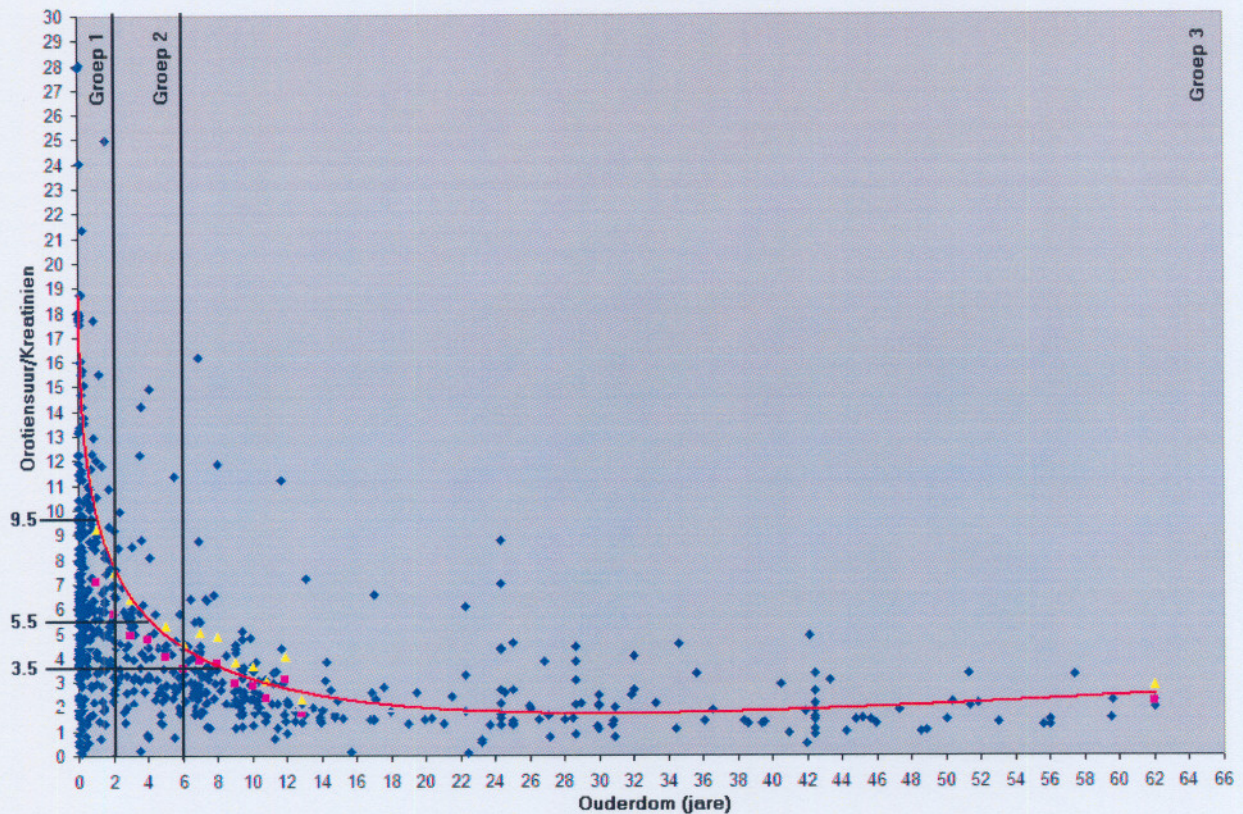
Figuur 4.4.2.1 *Verspreidingskurwe van die orotiensuuruitskeiding van pasiënte wat medikasie ontvang het (valproaat, antibiotika, parasetamol)*

Die resultaat in Figuur 4.4.2.1 toon dat medikasie geen of 'n baie klein invloed op die uitskeiding van orotiensuur het. Hierdie groep pasiënte is verwyder uit die abnormale groep wat reeds die sensitiwiteit van die tegniek verbeter het met ongeveer 3%. Meerdere medikasie mag hier betrokke wees maar alle inligting word egter nie altyd van al die pasiënte ontvang nie en alle medikasie is nie altyd opspoorbaar met behulp van die tegniek wat uitgevoer word nie. Ander medikasie mag dus 'n invloed hê wat nie hier in aanmerking geneem is nie.

4.4.2.2 Oudersomsverwantskap van urinêre orotiensuurkonsentrasies

'n Duidelike verwantskap tussen die uitskeiding van orotiensuur en die ouderdom van die pasiënte kan waargeneem word (Figuur 4.4.2.2(a)). Hoë uitskeiding kom voor kort na geboorte met 'n vinnige afname in die konsentrasies tot ongeveer op 'n ouderdom van 2 jaar. Effens hoër

konsentrasies word weer waargeneem by pasiënte van ongeveer 60 jaar. Op grond van die waardes is die pasiënte verdeel in 3 groepe. Groep 1 was pasiënte onder die ouderdom van 2 jaar, groep 2 pasiënte tussen die ouderdom van 2 en 6 jaar en groep 3 ouer as 6 jaar. Indien groter getalle pasiënte beskikbaar is kan die groepe selfs nog onderverdeel word.



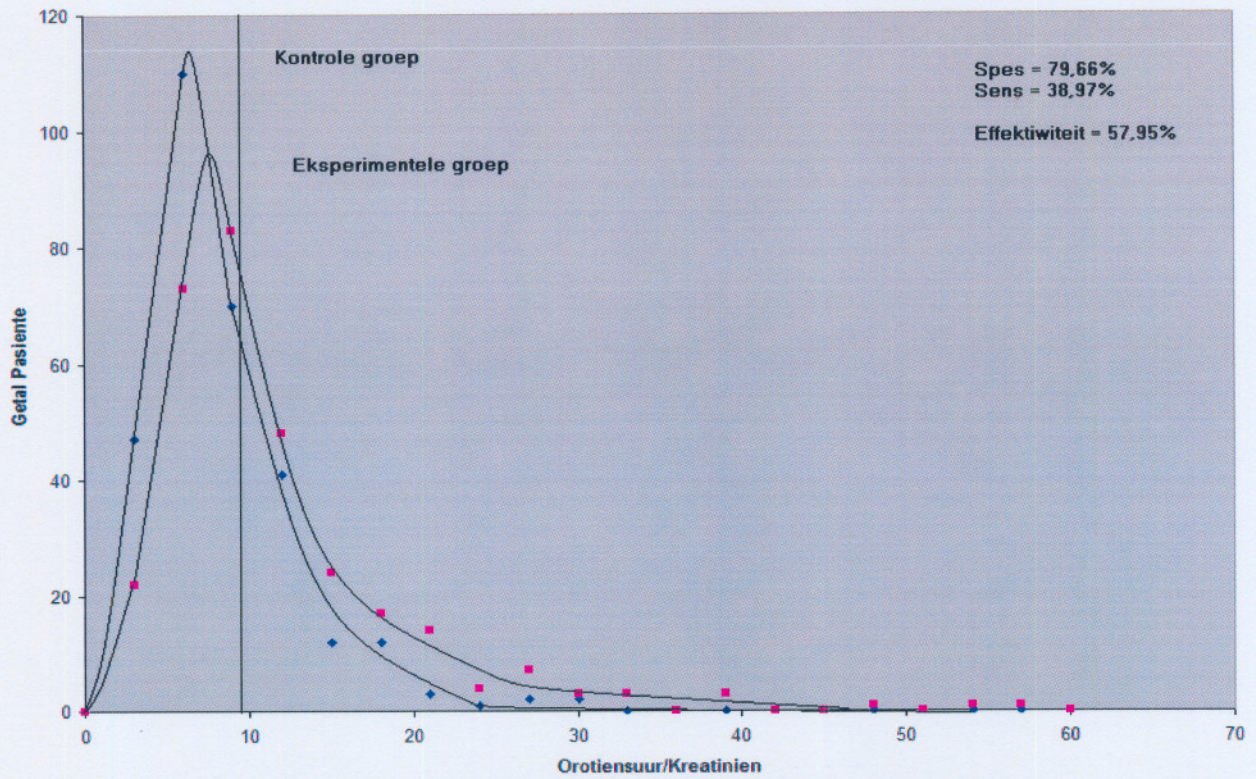
Figuur 4.4.2.2(a) Verband tussen ouderdom en orotiensuur uitskeiding

Die gemiddelde uitskeidingskonsentrasies en die standaardafwykings van die 3 groepe word in Tabel 4.4.2.2.1 weer gegee

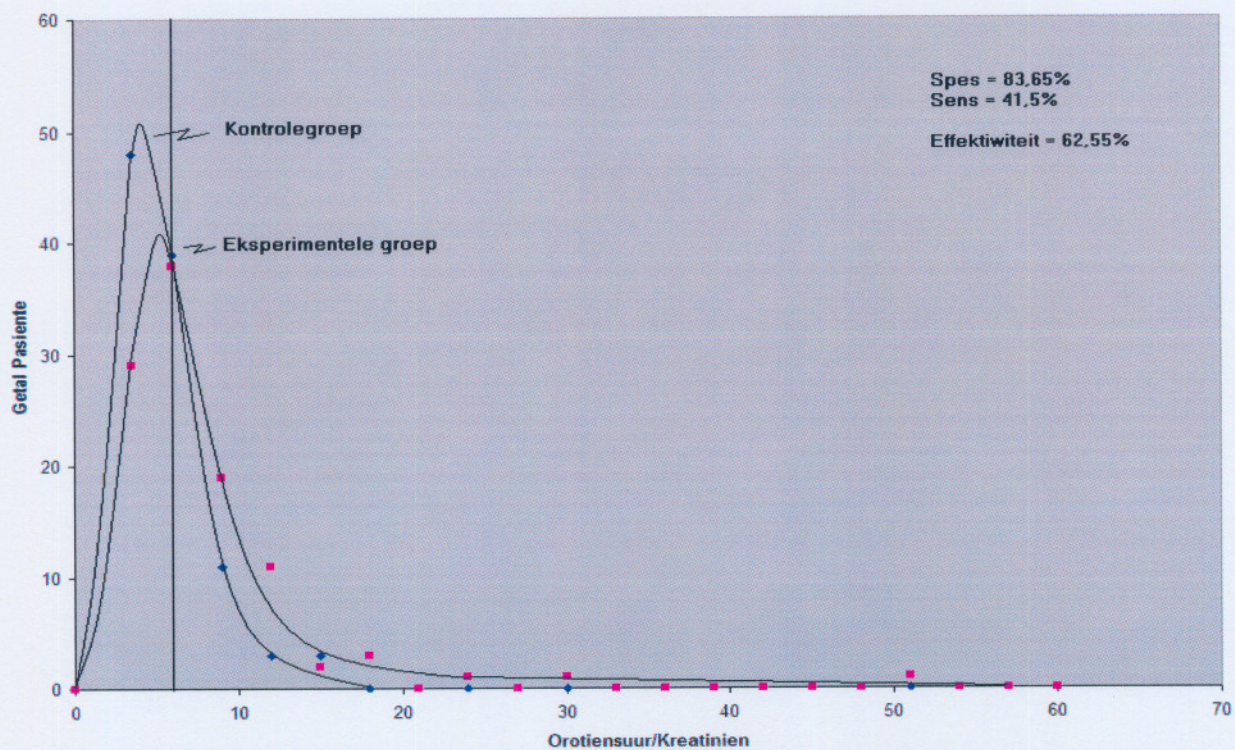
Tabel 4.4.2.2 Gemiddelde orotiensuurkonsentrasies van pasiënte in verskillende ouderdomsgroepe

		1 dag tot 2 jaar	2 jaar tot 6 jaar	6 jaar en ouer
Gemiddelde	mmol/mol kreatinien	7.10918	4.883375	2.692685
Standaardafwyking		4.687231	3.194721	1.826968

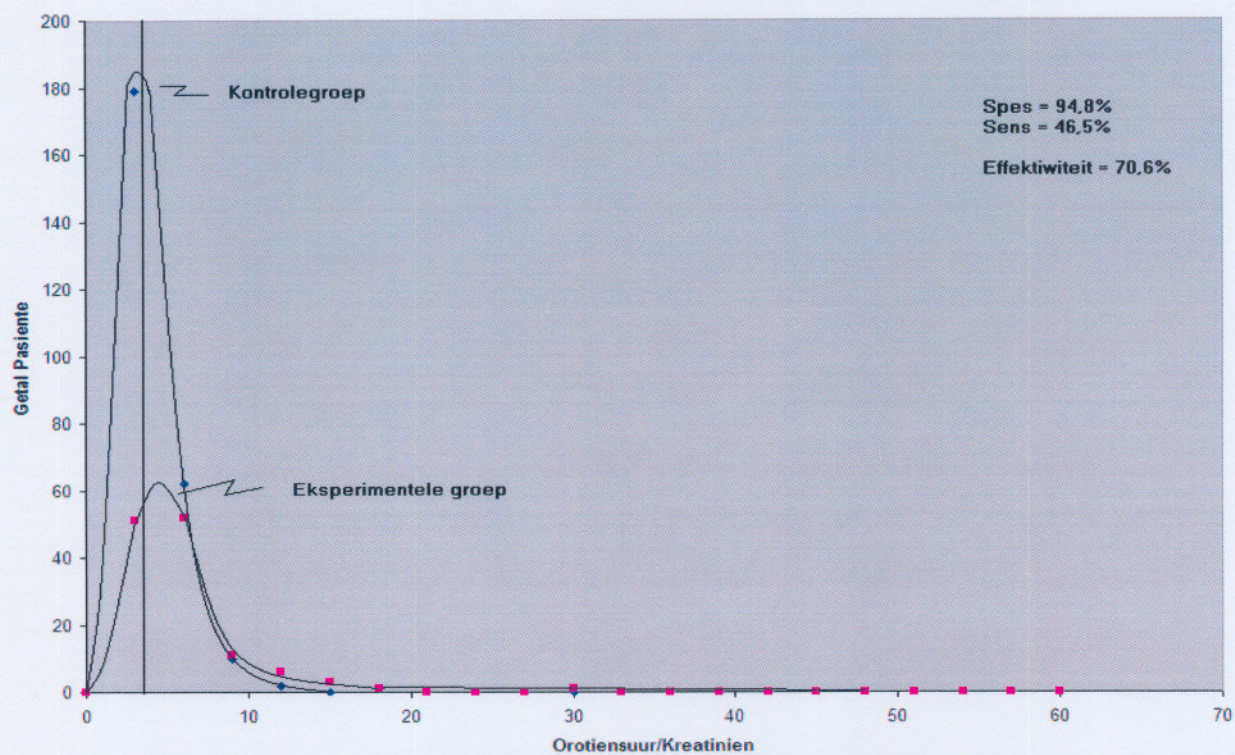
Die verband tussen ouderdom en die uitskeiding van orotiensuur is belangrik om in ag te neem. In die volgende figure (Figuur 4.4.2.2 (b), (c) en(d)) word 'n vergelyking getref tussen die normale pasiënte in die kontrolegroep en groepe met abnormaliteite van dieselfde oudersomsgroep.



Figuur 4.4.2.2(b) *Verspreidingskurwe van oudersomsgroep 1 dag tot 2 jaar*



Figuur 4.4.2.2 (c) Verspreidingskurve van oudersomsgroep 2 jaar tot 6 jaar



Figuur 4.4.2.2(d) Verspreidingskurve van oudersomsgroep ouer as 6 jaar

Die verdeling van die pasiënte volgens ouersomgroepe verbeter die effektiwiteit van die siftingstoets, hoewel die effektiwiteit steeds nie binne aanvaarbare grense van ongeveer 80% is nie. Baie metaboliese defekte lei egter nie tot verhoogde orotiensuur nie, maar is ingesluit in die eksperimentele groepe. Die moontlikheid bestaan dat die defekte wat wel tot verhoogde orotiensuur lei wel effektief geïdentifiseer kon word. In die 'n latere gedeelte van die studie (4.5) sal die moontlikheid verder ondersoek word.

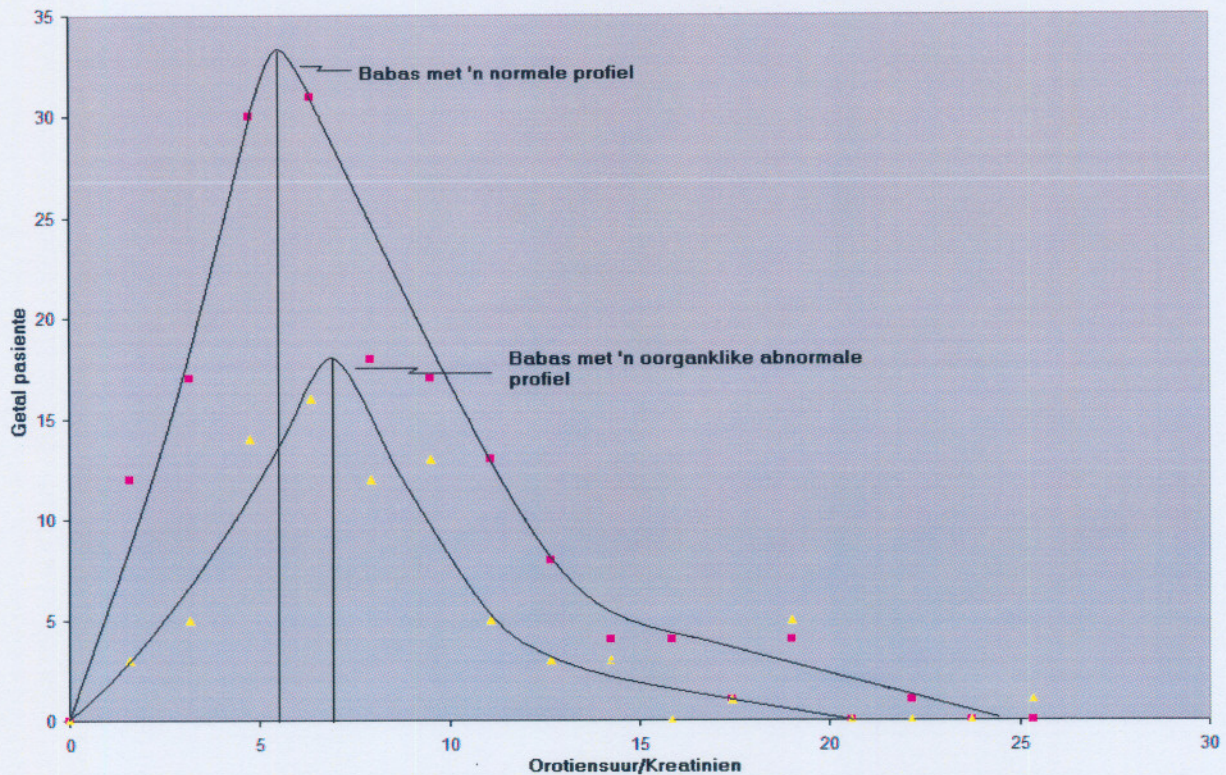
4.4.2.3 Geslagsafhanklike uitskeiding van orotiensuur.

Die moontlikheid dat geslag 'n verdere rol kan speel is ondersoek deur die drie groepe pasiënte volgens geslag te verdeel en verdere verspreidingskurwes te verkry. Hierdie resultaat het egter aangetoon dat geslag geen invloed op die orotiensuur/kreatinien verhouding het nie, en om die rede sal die resultate nie hier weer gegee word nie.

4.4.2.4 Ander invloede op die uitskeiding van orotiensuur.

'n Abnormale metaboliëetprofiel word dikwels by babas onder die ouderdom van 1 jaar waargeneem. Die profiel word gekenmerk aan gering verhoogde laktose, glukose, galaktose, verkeie aminosure maar veral die aminosure en organiese sure soos 2-ketoglutaarsuur en soms 3-hidroksi-3-metielglutaarsuur. Die oorsprong van die abnormale profiel is nie bekend nie, maar kan moontlik aan onvolwasse ensiemsisteme toegeskryf word. Hierdie profiel korrigeer binne die eerste lewensjaar en is nie aanduidend van 'n metaboliese defek nie. Metaboliese laboratoriums verwys dikwels na die abnormale profiel as 'n "normale babaprofiel". Pasiënte wat die normale babaprofiel vertoon het, was ingesluit in die normale eksperimentele groep. Die effek van die oorganklike metaboliese toestand op die uitskeiding van orotiensuur is nagegaan deur die groep pasiënte onder die ouderdom van 1 jaar in twee groepe te verdeel. Die

eerste groep het absoluut geen abnormaliteite vertoon nie terwyl die tweede groep die oorganklike babaprofiel vertoon het (Figuur 4.4.2.4)



Figuur 4.4.2.4 Verspreidingskurwes van urinêre orotiensuur/kreatinien verhouding van babas met 'n normale metabolietprofiel en babas wat 'n oorganklike babaprofiel vertoon.

Volgens die resultaat soos vertoon in Figuur 4.4.2.4 het die abnormaliteite wat verantwoordelik is vir die uitskeiding van verbindings wat dikwels verhoog by babas voorkom wel 'n invloed ook op die uitskeiding van orotiensuur het. Die gemiddelde uitskeiding van orotiensuur van die twee groepe pasiënte word in Tabel 4.4.2.4 weergegee.

Tabel 4.4.2.4 Gemiddelde orotiensuur/kreatinien van babas wat 'n normale profiel en babas wat 'n oorganklike babaprofiel vertoon het.

	Normale profiel	Oorganklik baba profiel
Gemiddelde konsentrasie (mmol/mol kreatinien)	6.741	7.840
Standaard afwyking	4.503	4.977

Die verhoging van die orotiensuur by babas met 'n oorganklike babaprofiel is waarskynlik toe te skryf aan 'n toestand wat beskryf word as oorganklike hiperammonemia. Hierdie "defek" word nie as 'n metaboliese defek aanvaar nie, maar dit bemoelijk wel die onderskeid tussen normale babas en babas met metaboliese defekte.

4.5 Identifisering van defekte wat potensieel tot verhoogde orotiensuur lei.

Defekte wat potensieel tot verhoogde orotiensuur aanleiding kan gee is defekte van die pirimidienmetabolisme wat insluit orotiensuururie, (Orotiensuururie tipe I (Orotidiefosforilase defek), **orotiensuururie tipe II** (Orotidieldekarboksilase defek), defekte wat tot verhoogde ammoniakvlakke lei wat insluit ureumsiklus defekte, uitsluitend defekte wat tot verlaagde karbamoïelfosfaat lei, organiesesuururieë soos propioonsuururie en defekte van die aminosuurmetabolisme wat indirek die ureumsiklus beïnvloed soos hiperlisienemie, HHH-sindroom en lisien-proteïenintoleransie. Ander metaboliese defekte kan ook indirek tot verhoogde ammoniak aanleiding gee hetsy deur lewerbeskadiging of verhoogde aminosuorkatabolisme tydens defekte wat tot verlaagde energiemetabolisme lei. Hierdie defekte sluit veral in defekte soos glikogeenstoringsdefekte, , fruktosurie, tisosienemie en vetsuorkataboliese defekte.

Vir die bestudering van die identifisering van die defekte deur middel van orotiensuurbepaling sal die eksperimentele groep pasiënte onderverdeel volgens die hoofgroepe defekte wat bestaan. Die hoofgroepe sluit in aminosuururieë, organiesesuururieë, koolhidraatmetaboliese defekte, purien- en pirimidien metaboliese defekte, ureumsiklusdefekte, vetsuurmetaboliese defekte, oligosakkariedmetaboliese defekte en mukopolisakkariedose. Die defekte wat potensieel tot verhoogde orotiensuur uitskeiding aanleiding kan gee sal verder onder soek word.

4.5.1 Defekete van die pirimidienmetabolisme

Slegs een pasiënt met 'n defek van die pirimidienmetabolisme (dihidropirimidiendehidrogenase defek) is gedurende die tydperk opgespoor en dus kon die metode nie werklik in die opsig geëvalueer word nie. Die pasiënt was 'n volwasse vrou wat opgespoor is deur middel van GC-MS-analises en die teenwoordigheid van timien en urasil in die uriene. Haar orotiensuur uitskeiding was binne die normaal grense. Materiaal van 2 bekende orotiensuururie pasiënte was egter beskikbaar. Beide die pasiënte se orotiensuuruitskeiding was onderskeidelik 254,2 en 219,8 mmol/mol kreatinien. Daar was egter slegs voldoende materiaal van een van die pasiënte vir gevorderde analise. As gevolg van die hoë konsentrasies van die metaboliete kon kapillêre elektroforese uitgevoer word. Die resultaat is getoon in Figuur 4.3.2(d). Volgens die analise was die werklike orotiensuurkonsentrasie 298,2 mmol/mol kreatinien in vergelyking met die 219,8 mmol/mol kreatinien wat met behulp van die kolometriese metode verkry is.

4.5.2 Ureumsiklus defekte

Gedurende die tydperk van die studie is uriene van 7 pasiënte met ureumsiklus defekte ontvang (Tabel 4.5.2). Een van die pasiënte (8/29/8/03) was 'n bekende sitrullienemie pasiënt wat tans met natriumbensoaat behandel word, maar steeds is verhoogde orotiensuurkonsentrasies uitgeskei. Al die defekte van die ureumsiklus kan met redelike sukses behandel word, maar defekte van die ensiem ornitientranskarmilase (OTC) het besondere emosionele gevolge. Die X-gekoppelde defek veroorsaak dood reeds op 'n vroeë leeftyd by seuntjies maar kan ook soortgelyke gevolge hê by dogtertjies indien hulle nie vroegtydig gediagnoseer word nie. Om die rede en omrede orotiensuurbepaling die enigste siftingstoets is wat die defek kan opspoor sal meer aandag aan die defek gegee word. Die kliniese geskiedenis van

2 (4/25/6/03 en 11/7/10/03) van die pasiënte wat tydens die tydperk van die studie opgespoor is sal ook bespreek word.

Tabel 4.5.2 *Orotiensuurkonsentrasies gevind in uriene van pasiënte met ureumsiklus defekte*

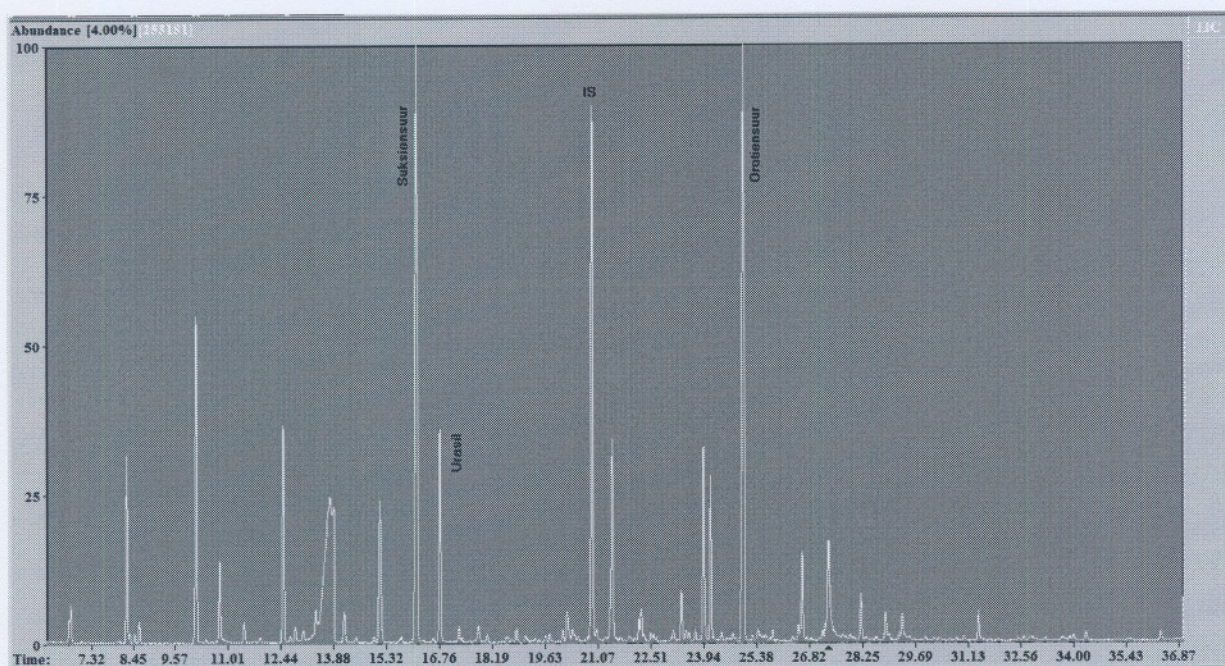
Pasiënt	Geslag	Ouderdom	Orot-suur/kreatinien (mmol/mol)		Defek
			Kolometries	GC-MC	
6/2/6/04	Vroulik	1.047	19.18	17,8	*Verhoogde ornitien
7/4/6/02	Manlik	0.003	72.1	81,9	HHH sindroom
9/22/10/03	Vroulik	0.271	24.49	22,89	*Verhoogde arginien
12/9/9/02	Manlik	0.197	147.648	141,8	OTC defek
8/29/8/03	Manlik	17.041	182.56	190,2	Sitrullienemie-opvolg
4/25/6/03	Manlik	3.243	204.67	228,3	OTC defek
11/7/10/03	Vroulik	6.956	273.936	438,97	OTC defek

* *Diagnose nie finaal nie*

4.5.2.1 Pasiënt 4/25/6/03

Pasiënt 4/25/6/03 was die eerste kind ('n seuntjie) van onverwante ouers wat kort na geboorte met Klinefelter sindroom (47xxy) gediagnoseer is. Die pasiënt het op 'n 3 jarige ouderdom presenteer met vertraagde mylpale, ataksia, geïrriteerdheid en selfbeseringsneiging. Na die inname van 'n hoë proteïenmaal het die simptome akuit na vore gekom en die pasiënt het presenteer met aanvalle en respiratoriese stilstand. By opname is verhoogde ammoniak en lewerensieme bevind en 'n ureumsiklusdefek is vermoed. Die orotiensuurvlakke was sterk verhoog (204,67 mmol/mol kreatinien). Organiesesuuranalises is uitgevoer en die totale ioonprofiel word in Figuur 4.5.2.1 weergegee. Volgens die GC-MS analises was orotiensuur verhoog (228,3 mmol/mol kreatinien) en urasil was opgemerk teen verhoogde konsentrasies. Die pasiënt is behandel met 'n lae proteïendieet en natriumbensoaat en fenielbutiraat suplementasie. Tydens herhaalde analises na die behandeling het die orotiensuurkonsentrasies afgeneem na 20 mmol/mol kreatinien terwyl die bloed ammoniakvlakke genormaliseer het. Die kliniese beeld van die pasiënt het verbeter na die behandeling hoewel milde verstandelike agterstand steeds teenwoordig is. Kort na die diagnose van pasiënt

4/25/6/03 is 'n tweede seuntjie in die familie gebore. Tydens analyses van materiaal van die baba kon geen abnormaliteite waargeneem word nie.

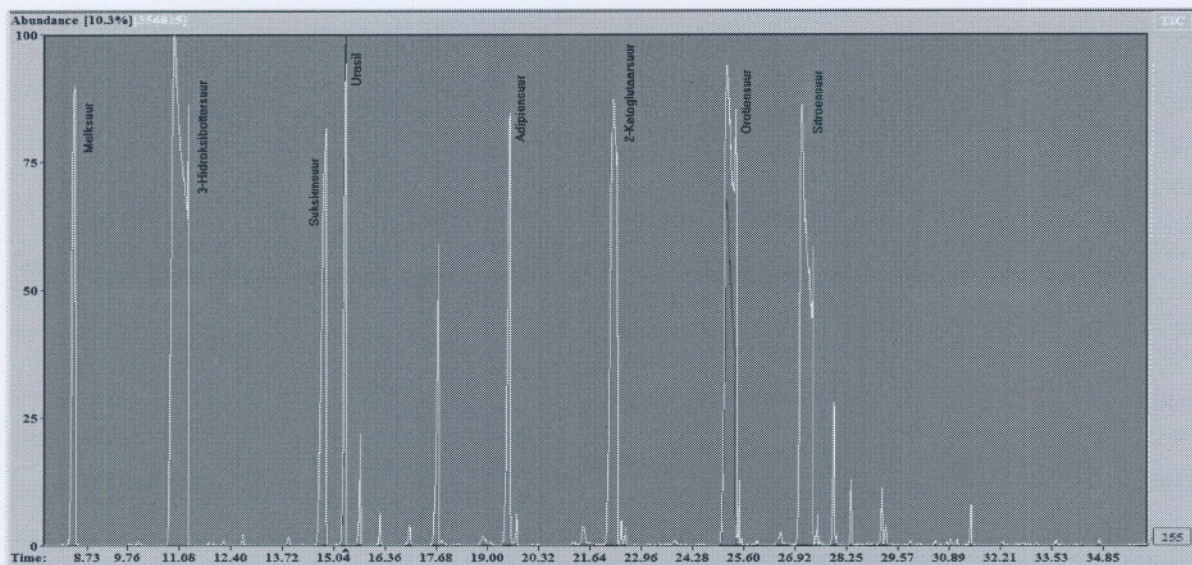


Figuur 4.5.2.1 Totale ioonprofiel van organiese suur GC-MS analises van pasiënt 4/25/6/03

4.5.2.2 Pasiënt 11/7/10/03

Pasiënt 11/7/10/03 was die eerste kind ('n dogtertjie) van onverwante ouers. Die tweede kind ('n dogtertjie) was normaal. Die pasiënt het normale ontwikkeling getoon, maar het reeds op 'n vroeë ouderdom spontaan 'n lae proteïendieet gevolg. Abnormale gedrag en geïriteerdheid het veral voorgekom indien die pasiënt vastend was, byvoorbeeld ná 'n skooldag. Haar gedrag het verbeter na die inname van voedsel. Tydens hospitalisering van die moeder het die simptome van die pasiënt akut na vore gekom (waarskynlik as gevolg van langer vastende tye). Die vader het die pasiënt in 'n koma gevind en sy is as dood verklaar by die aankoms in die hospitaal. Uriene is nadoods verkry. Die orotiensuurkonsentrasies was baie verhoog gewees 273,9 mmol/mol

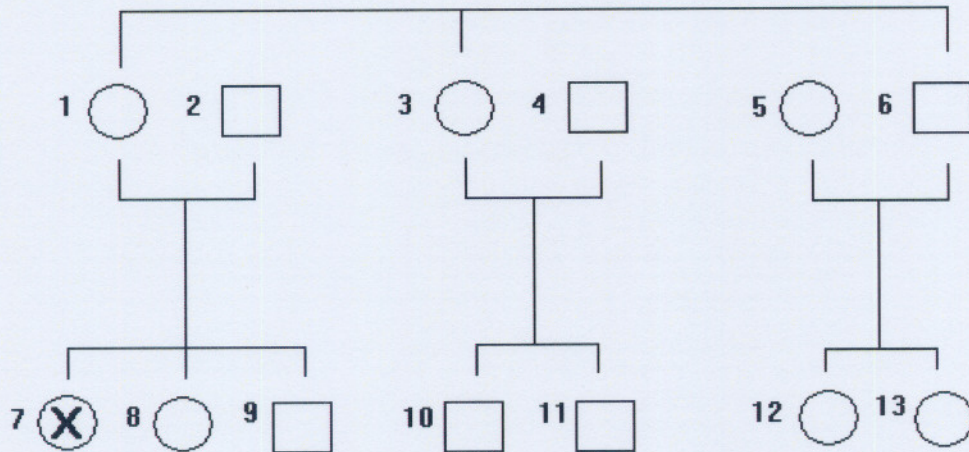
kreatinien. Organiesesuur analises is uitgevoer (Figuur 4.5.2.2 (a)). Die analise het aangetoon dat die konsentrasies orotiensuur selfs hoër was (438,97 mmol/mol kreatinien). Verskeie ander metaboliete was ook verhoog wat ingesluit het 3-hidroksibottersuur en asetoasynsuur. Die teenwoordigheid van die metaboliete het die vermoede van 'n vastende toestand bevestig. Melksuur en Krebs siklus metaboliete, wat ook verhoog was dui op die verkryging van die uriene nadoods. 'n Derde baba (seuntjie) is op dieselfde dag gebore as wat die pasiënt oorlede is. Geen abnormaliteit kon in die uriene van die baba waargeneem word nie.



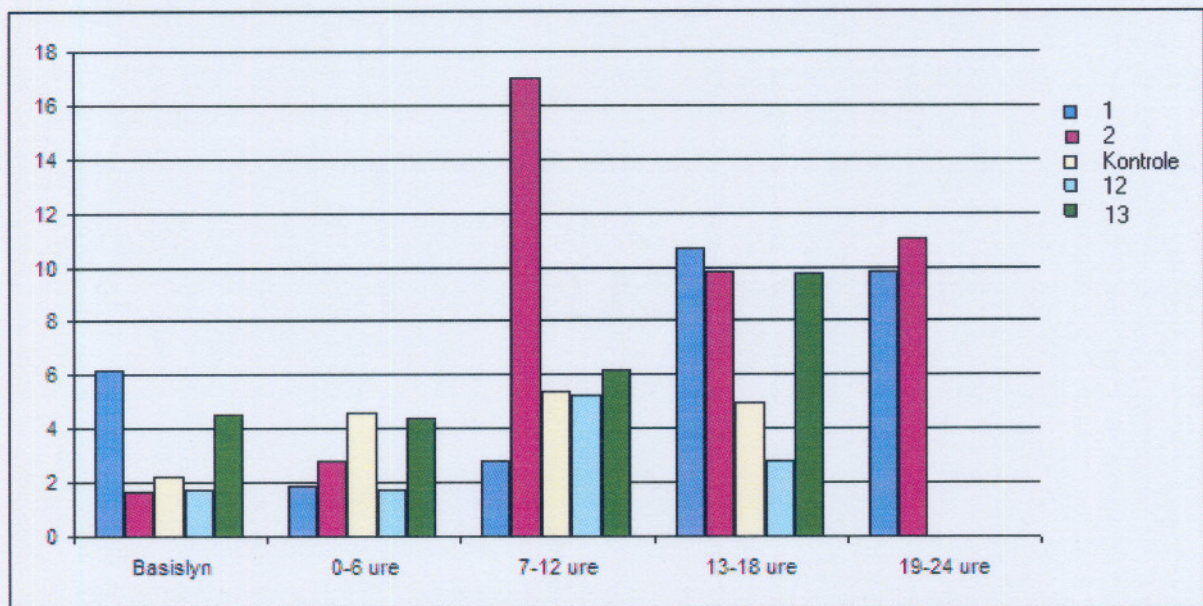
Figuur 4.5.2.2(a) Totale ioonprofiel van organiese suur GC-MS analises van pasiënt 11/7/10/03

Volgens die literatuur ontstaan ongeveer 30% OTC defekte as gevolg van 'n nuwe mutasie, nogtans is dit uiters belangrik om vroulike familieledede te ondersoek vir die teenwoordigheid van die defek. In die huidige studie is die familieledede van laasgenoemde pasiënt verder ondersoek deur middel van 'n allopurinol belading soos bespreek in Hoofstuk 3. In Figuur 4.5.2.2(b) word die stamboom van die familie uiteengesit. Slegs die

vroulike persone in die familie is 'n belading op uitgevoer en die resultate word in Figuur 4.5.2.2(c) grafies voorgestel.



Figuur 4.5.2.2(b) (1) Moeder (2) Vader (3) Moeder's suster (4) Eggenoot (5) Moeder's broer (6) Eggenote (7) Pasiënt (8) Broer (9) Suster (10) Neef 1 (11) Neef 2 (12) Niggie 1 (5).5 jaar (13) Niggie 2 (9 jaar)



Figuur 4.5.2.2(c) Orotiensuur/kreatinien konsentrasie van 'n familie met 'n geskiedenis van OTC-defek na 'n allopurinolbelading. (Sien stamboom vir identifikasie)

Die orotiensuurkonsentrasies van die kontroles (4) persone se gemiddelde waardes was binne die normaal grense voor belading asook die individuele waardes. In die uriene versamel tussen 7 tot 12 uur na belading is 'n konsentrasie bereik wat ongeveer 2 keer hoër was as voor die belading. Die orotiensuur was onder die detekselimiete van die GC-MS metode. Die moeder van die pasiënt het verhoogde orotiensuur uitgeskei voor die belading maar die uitskeiding het aanvanklik verlaag na die belading gevolg deur 'n toename tot drie keer die normale konsentrasie en meer as twee keer die konsentrasies uitgeskei deur die kontrole persoon. Die suster van die moeder het aanvanklik normale konsentrasies uitgeskei, maar na die belading het die konsentrasies toegeneem tot meer as 5 keer die normale waarde. Beide die moeder sowel as haar suster se orotiensuur uitskeiding was binne die deteksie limiete van die GC-MS metode en urasil is ook waargeneem. Pasiënt 12 se uitskeidingspatroon was identies aan die van die kontrole. As Figuur 4.5.2.2(c) bestudeer word wil dit voorkom of pasiënt 13 ook verhoogde uitskeing vertoon het. Hierdie pasiënt is egter onder die ouderdom van 6 jaar en as die toename gemeet word in terme van die normaalkonsentrasies vir die ouderdomgroep het die orotiensuur uitskeiding slegs 2 keer verhoog wat vergelykbaar is met die kontrole pasiënt.

Hoewel meer resultate benodig word vir 'n finale gevolgtrekking wil dit voorkom of beide die moeder en haar suster OTC-defek het. Hierdie resultaat stem goed ooreen met vergelykbare studies in die literatuur. Belading op pasiënt 13 moet herhaal word wanneer die pasiënt ouer is. Tydens die belading was die pasiënt bykans 6 jaar oud en hoewel die konsentrasies vir haar ouderdomsgroep waarskynlik normaal is kan die konsentrasiegrense nie altyd so streng toegepas word nie.

Dit is egter onrusbarend dat beide die moeder van die pasiënt, sowel as die moeder se suster verskeie kere orotiensuur binne die normale grense

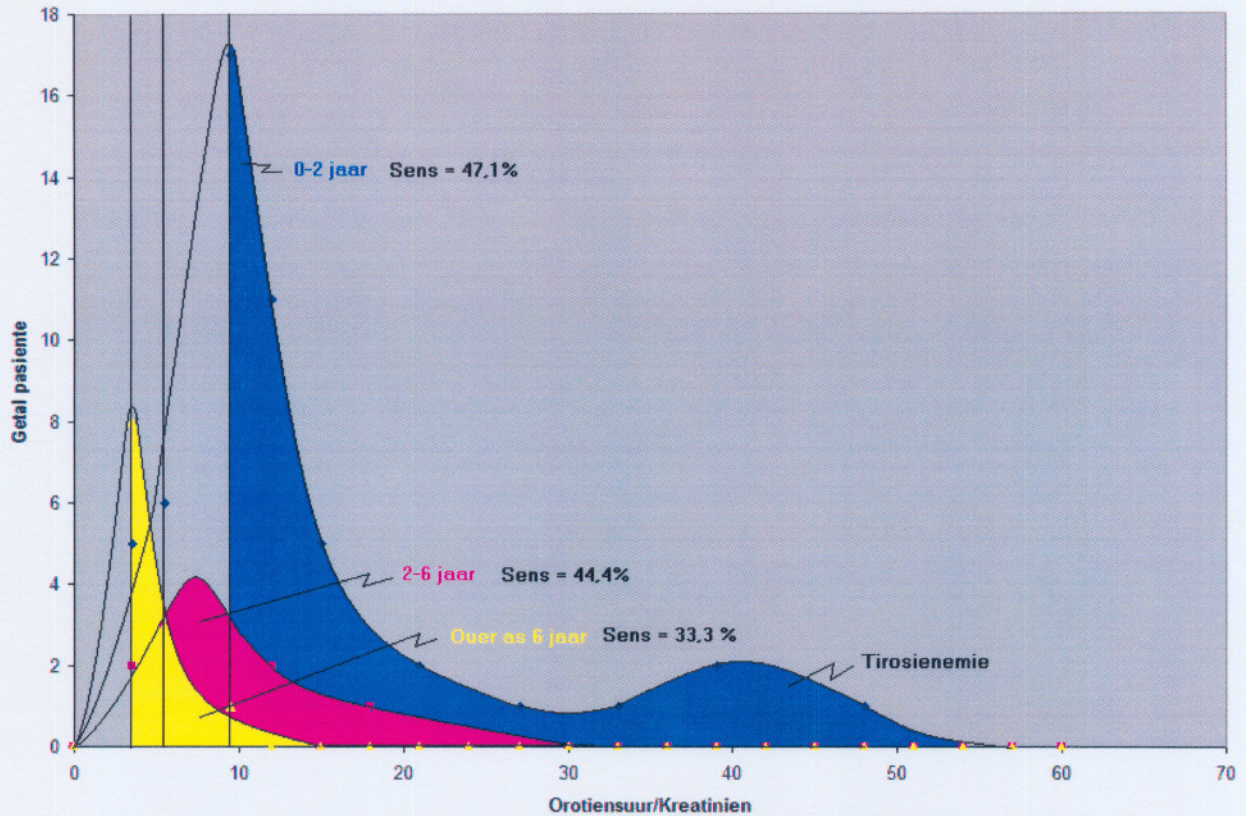
uitgeskei het. Tydens akute simptome is OTC-defek maklik identifiseerbaar maar andersins sal die tegniek nie vir die doel aangewend kan word nie, behalwe as die kliniese beeld op die moontlike teenwoordigheid van die defek dui. 'n Kliniese beeld van gedragsafwykings wat vererger as die pasiënt proteïene inneem of vastend is behoort opgevolg te word met 'n orotiensuurbepaling of allopurinolbelading.

Dit is tans nog nie seker waarom sommige persone hewig reageer op die defek terwyl 'n volgende persoon met dieselfde defek bykans geen simptome vertoon nie. Aangesien OTC-defek 'n X-gekoppelde defek is, is die respons van seunjies logies, dit is egter moontlik dat die vorming van poolligame van die tweede X-chromosoom by dogertjies 'n rol kan speel. Die hoeveelheid ensiemaktiwiteit sal dus bepaal word deur die hoeveelheid X-chromosome met die normale alleel wat nie in poolligame ingesluit word nie. Die pasiënt met Klinefelter sindroom en OTC-defek is sover bekend die eerste in die wêreld wat opgespoor is. Die oorlewing van die pasiënt kan toegeskryf word aan die tweede X-chromosoom wat teenwoordig is.

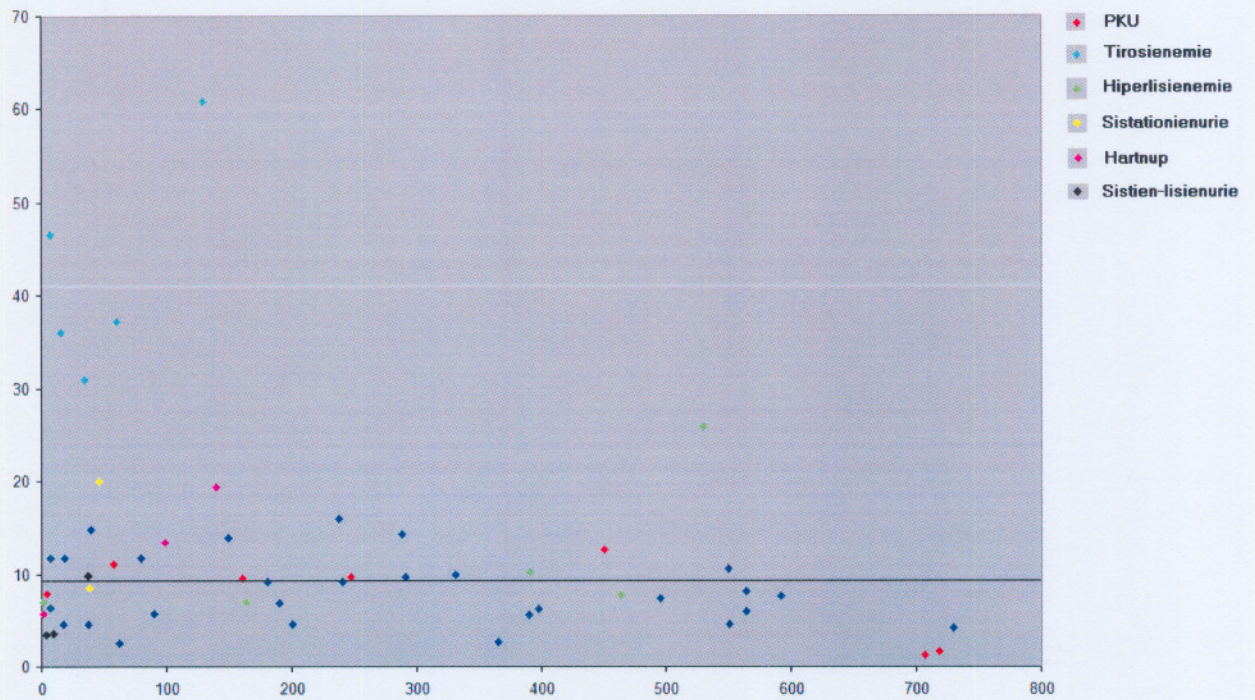
4.5.3 Aminosuurmetaboliese defekte.

Die orotiensuur/kreatinien konsentrasies was nie effektief vir die opsporing van die defekte van die aminosuurmetabolisme nie (Figuur 4.5.3(a)), met die uitsondering van tirosienemie pasiënte wat deurgaans verhoogde waardes orotiensuur uitgeskei het (Figuur 4.5.3(b)) en 1 pasiënt met lisien-proteïen intoleransie (Figuur 4.5.3(c)) wat 'n geweldig hoë konsentrasie orotiensuur vertoon het (273,9 mmol/mol kreatinien) (Die resutate van die pasiënte is nie ingesluit by onderstaande grafiese voorstelling nie omrede dit die totale grafiek domineer). Die meerderheid pasiënte in die groep het 'n algemene aminosuururie vertoon, wat aan verskeie oorsake toegeskryf kan word. Die pasiënte met algemene aminosuururie, insluitend pasiënte met Hartnup se siekte en tirosienemie

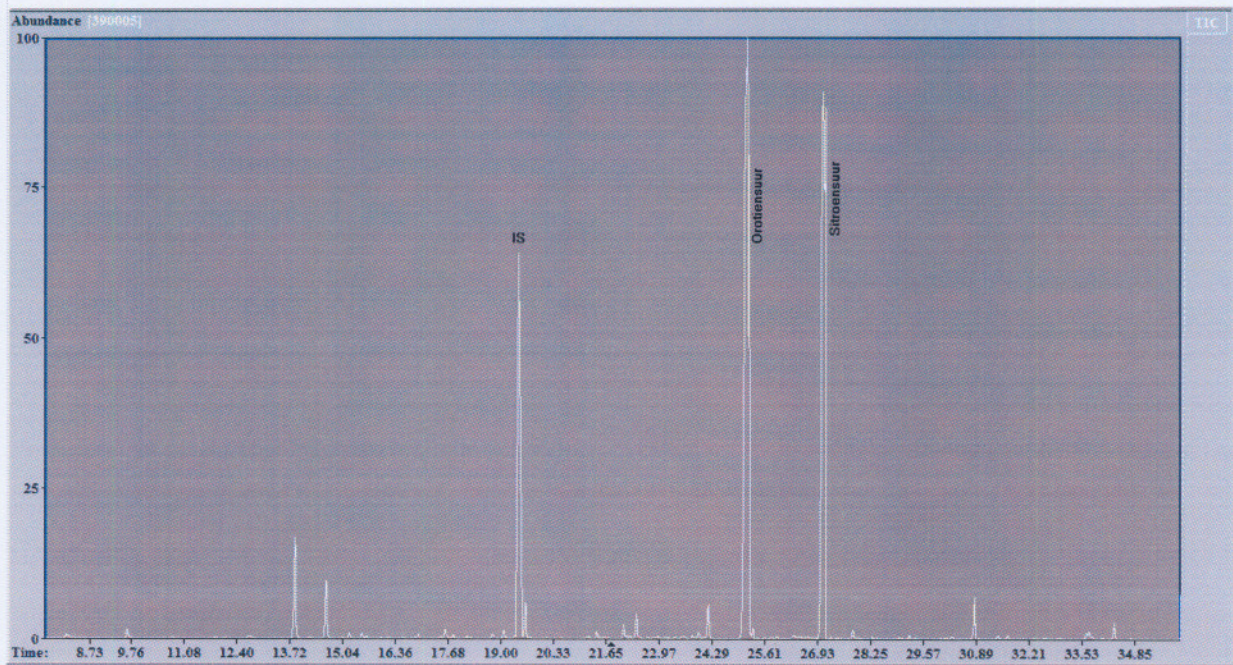
kon die verhoogde orotiensuurkonsentrasies nie met behulp van GC-MS analyses bevestig word nie. Verhoogde kolometriese meting van orotiensuur was dus in die geval vals positiewe waardes, waarskynlik as gevolg van die verhoging van histidien wat dikwels tydens algemene aminosuururie teen verhoogde konsentrasies in uriene aangetref word.



Figuur 4.5.3(a) *Verspreidingskurwes van die orotiensuurkonsentrasies van pasiënte wat abnormale urinêre aminosure vertoon het.*



Figuur 4.5.3(b) *Specifieke waarden van groep1 patiënte*

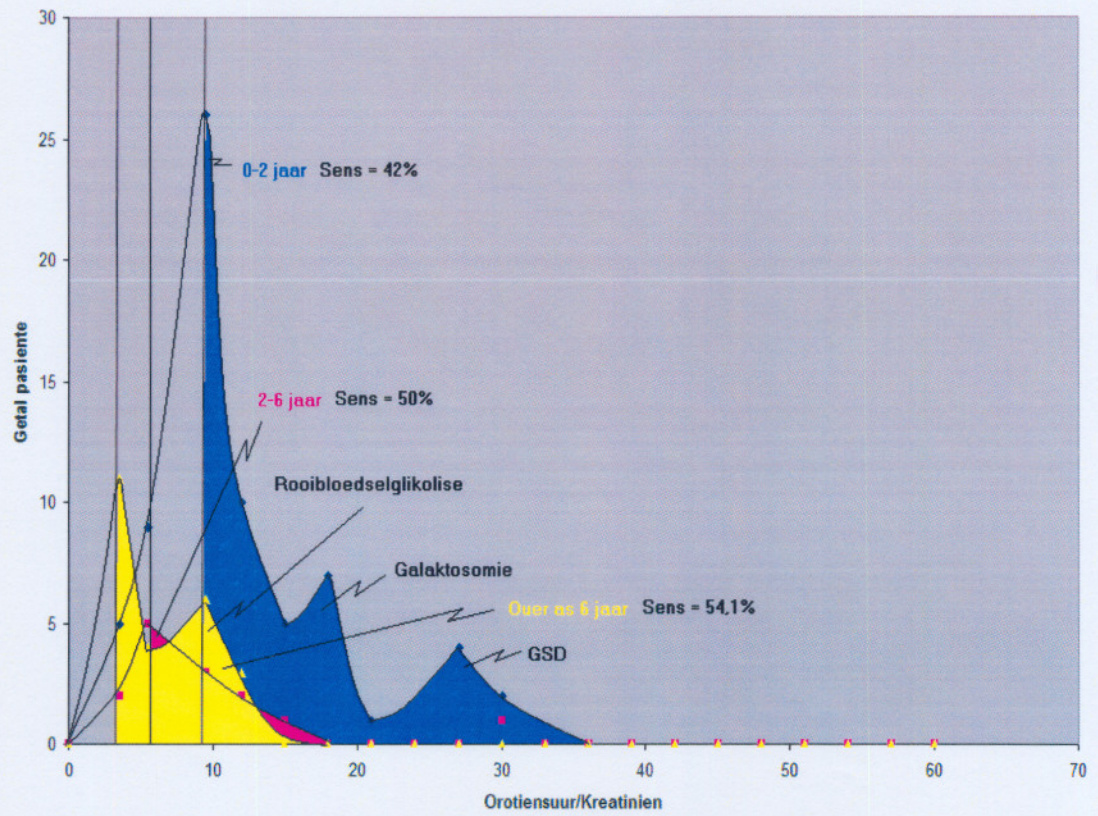


Figuur 4.5.3(c) *Totale ienprofiel van organiese suur GC-MS analyses van pasiënt met lisen-proteïenintoleransie*

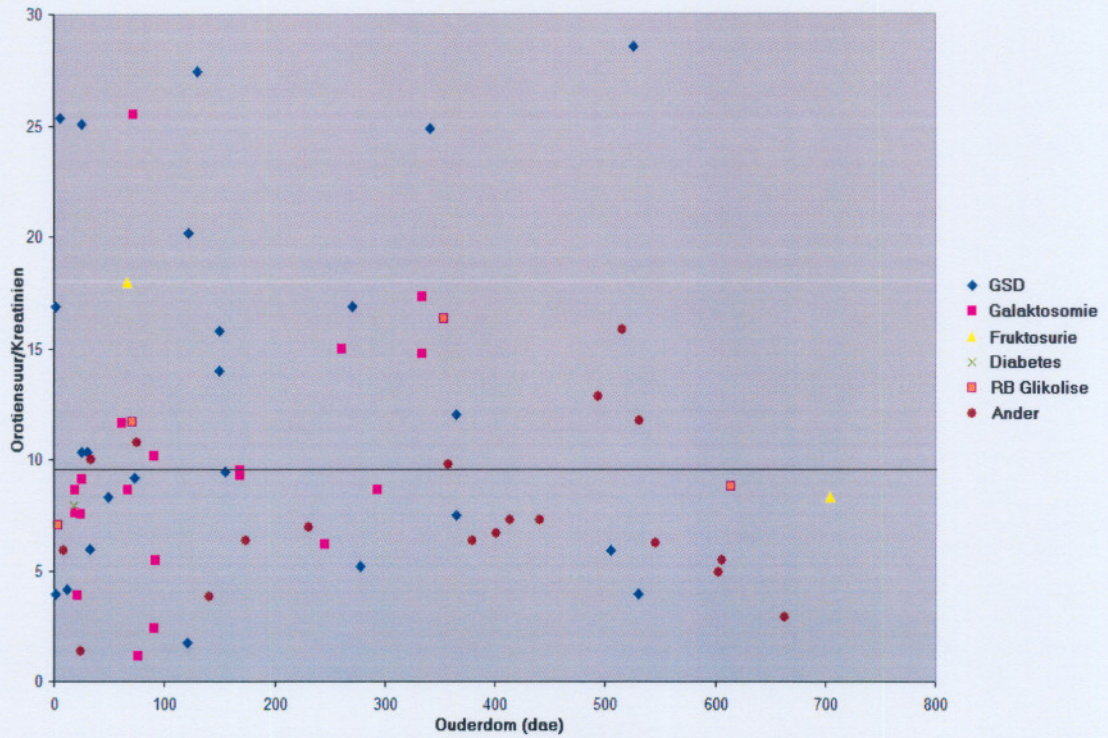
Die bydrae van orotiensuurbepaling as 'n siftingstoets vir aangebore metaboliese defekte van die aminosuurmetabolisme is waarskynlik beperk tot lisien-proteïenintoleranasie en hiperlisienemie. Hoewel die twee defekte nie 'n hoë voorkoms in Suid-Afrika het nie is die vinnige opsporing en behandeling van die defekte noodsaaklik. Verhoogde ammoniak kan ernstige gevolge hê en om die rede is dit noodsaaklik dat die defekte so gou as moontlik behandel moet word.

4.5.4 Koolhidraatmetabolisme defekte

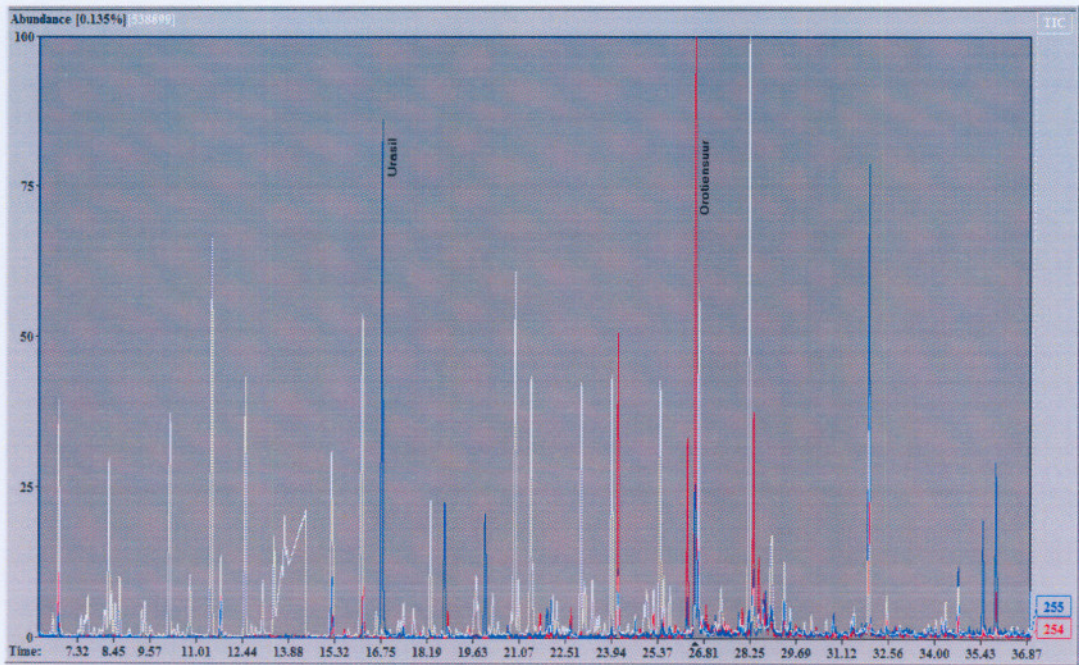
Defekte van die koolhidraatmetabolisme wat energiemetabolisme beperk lei dikwels tot verhoogde aminosuorkatabolisme en gevolglik verhoogde ammoniakvlakke. Glikogeenstoringsdefekte, (galaktoseuridieltrensferase defek) en familiale fruktosurie lei ook tot lewerskade wat gevolglik ammoniakvlakke verder verhoog. Verhoogde orotiensuurvlakke is veral waargeneem by pasiënte met glikogeenstoringsdefekte (Figuur 4.5.4 (a) en 4.5.3 (b)). In die studie is die subtypes egter nie bepaal nie, maar die moontlikheid dat spesifieke glikogeenstoringsdefekte verhoogde orotiensuur veroorsaak is nie uitgesluit nie. is een van die mees algemene defekte in Suid-Afrika. Verhoogde orotiensuur is ook dikwels by die pasiënte waargeneem. Die verhoging is in al die gevalle met behulp van GC-MS (Figuur 4.5.3 (c) en 4.5.3 (d)) bevestig. Die verhoging in die orotiensuurvlakke was egter nie konstant nie. Slegs ongeveer 50% van die defekte het positief getoets. Die verhoging is waarskynlik afhanklik van lae koolhidraatinname met gevolglike verhoging van aminosuorkatabolisme. Soos in die geval van die aminosuurmetaboliese defekte kan die toets nie aangewend word as 'n betroubare siftingstoets nie, nogtans kan dit waardevolle inligting verskaf indien die kliniese beeld in ag geneem word en as ander siftingstoetse ook uitgevoer word.



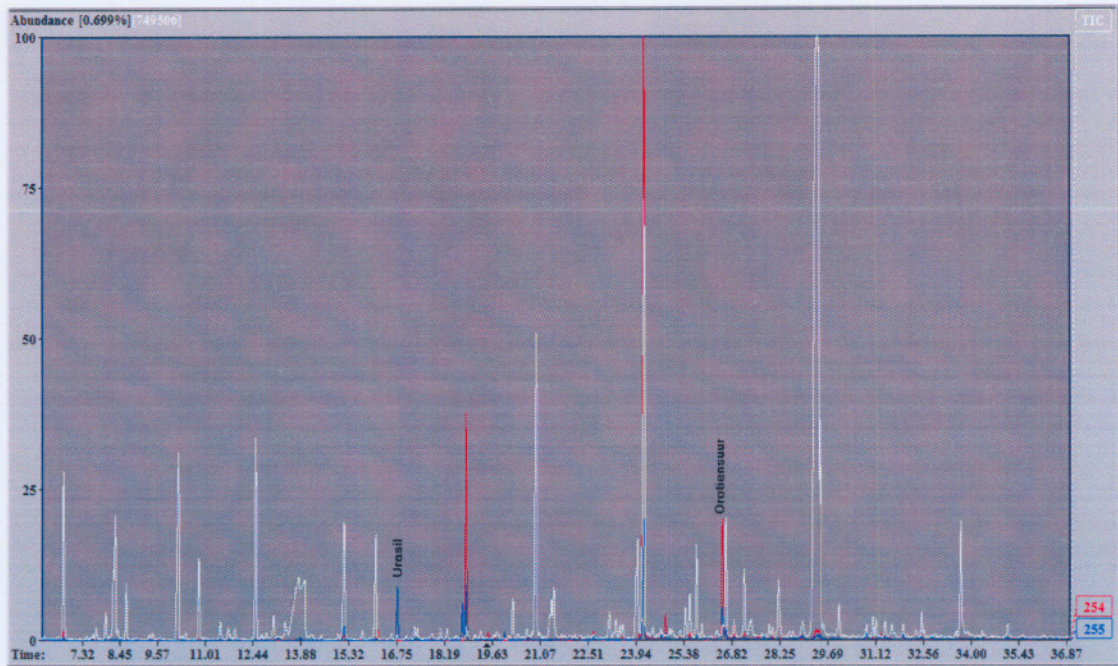
Figuur 4.5.4(a) Verspreidingskurwes van die orotienuurkonsentrasies van pasiënte wat abnormale urinêre koolhidrate vertoon het.



Figuur 4.5.4(b) *Specifieke waarden van groep1 patiënte*



Figuur 4.5.4(c) *Totale ionprofiel van organiese suur GC-MS analyses van pasiënt met glikogeenstoringsdefekte*



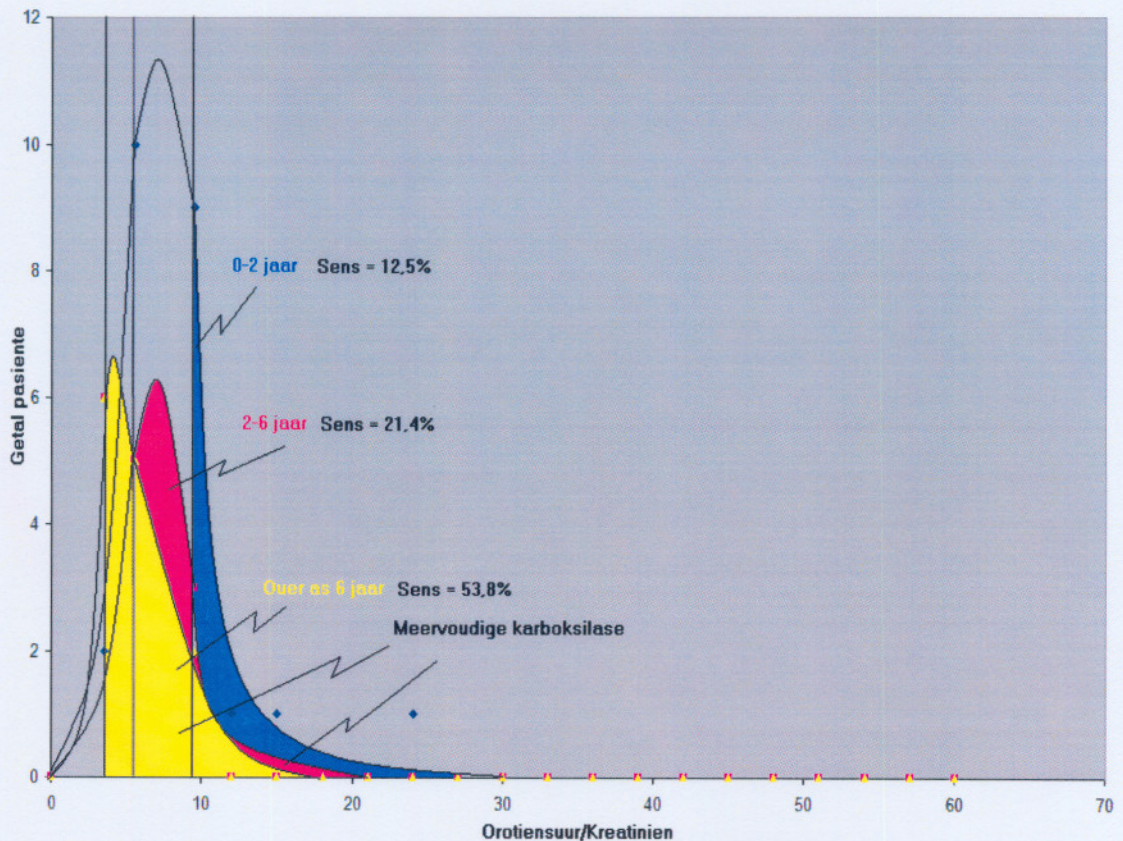
Figuur 4.5.4(d) Totale ionprofiel van organiese suur GC-MS analyses van pasiënt met galaktosemie

4.5.5 Organiese-suurmetabolisme

'n Verskeidenheid defekte van die organiese suurmetabolisme is bekend vir die teenwoordigheid van hiperammonemie. By defekete soos propioonasidemie en metielmaloonasidemie word hiperammonemia bykans konstant gevind en vlakke wat selfs hoër is as by ureumsiklus defekte word gereeld beskryf. Verskeie pasiënte met bogenoemde defekte is gedurende die tydperk van die studie opgespoor, maar verbasend was die ortiensuurvlakke in die uriene van die pasiënte bykans deurgaans normaal (Figuur 4.5.5). Hierdie tendens sluit aan by die oorsaak van hiperammonemie by die defekte. Verskeie outeurs het bevind dat propioonsuur en waarskynlik N-propionielglutamiensuur, wat by die defekte vorm, karbamoïelfosfaatsintetase inhibeer. Die verhoogde

ammoniakvlakke by die pasiënte gaan dus nie gepaard met verhoogde karbamoïelfosfaat nie en dus ook nie orotiensuur nie.

Die enigste pasiënte in die groep met verhoogde orotiensuur was pasiënte met meervoudige karboksilase defek. Hierdie defekte, meestal as gevolg van defektiewe biotinidase, raak ook die ensiem pirovaatkarboksilase. Al die pasiënte met pirovaatkarboksilase defekte wat gedurende die tydperk van die studie opgespoor is het verhoogde orotiensuurvlakke getoon. Soos reeds genoem kan dit moontlik toegeskryf word aan verlaagde oksaalasynsuur wat die ureumsiklus benadeel.



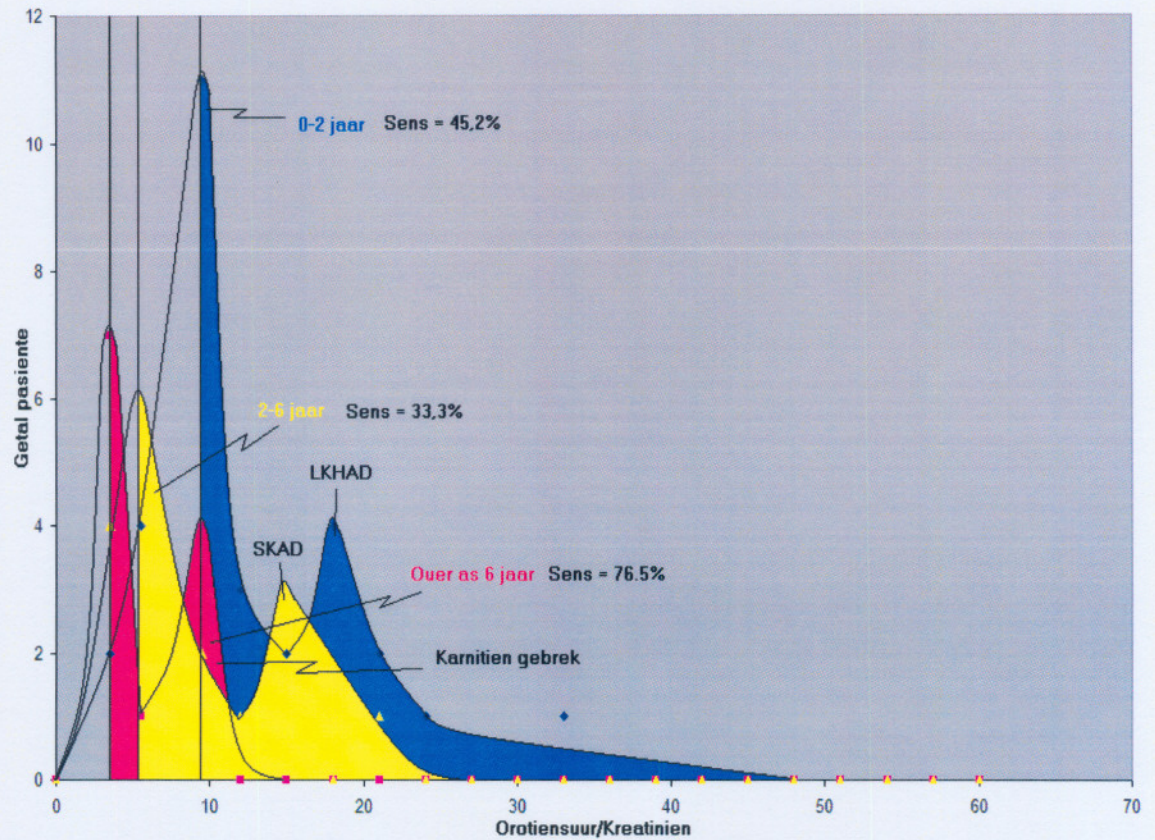
Figuur 4.5.5 Verspreidingskurwes van die orotiensuurkonsentrasies van pasiënte wat abnormale urinêre organiese sure vertoon het

Die waarneming in die studie dat pasiënte met organiese suurmetsbolisme defekte nie orotiensuur uitskei nie kan 'n interessante toepassing vir die orotiensuur bepaling daar stel. Indien pasiënte wel verhoogde bloed ammoniak vlakke toon maar die orotiensuurvlakke blyk normaal te wees dui dit op 'n moontlike organiese suurmetsbolisme defek. Dieselfde reël geld ook vir aangebore defekte van die sintese van karbamoiëlfosfaat.

4.5.6 Vetsuurmetsbolisme

Defekete van die vetsuurkatabolisme, soos in die geval van defekte van die koolhidraatmetsbolisme het ook variërende resulate gelewer, wat waarskynlik weereens dieet afhanklik is (Figuur 4.5.6). Verhoogde orotiensuurvlakke is veral by defekte van hidroksi-asiel-KoA-dehidrogenase (LKHAD of LCHAD) waargeneem. Vetsuurkatabolisme defekte kan milde simptome veroorsaak en akute fases kom gewoonlik voor tydens hipoglisemie. Koma en selfs wiegiedood is 'n bekende verskynsel by die defekte. Indien uriene tydens die akute fase versamel word kan verhoogde orotiensuur verwag word, wat moontlik aan verhoogde aminosuur katabolisme toegeskryf kan word. As die pasiënt egter met glukose behandel word en daarna word urine versamel is dit te betwyfel of verhoogde orotiensuur steeds teenwoordig sal wees. Orotiensuurbepaling kan dus nie aanbeveel word as 'n siftingstoets vir die defekte nie.

Hoewel die bepaling van orotiensuur nie as 'n siftingstoets vir die defekte gebruik kan word nie verskaf dit tog waardevolle antwoorde. Veral by die ouer groep pasiënte is verhoogde orotiensuur opgemerk by pasiënte met karnities gebrek. Dit is nie bekend of die pasiënte 'n primêre of sekondêre karnities gebrek gehad het nie, maar die verhoging van orotiensuur en verlaging van vrye karnities kan aanduidend wees van 'n intra sêllure karnities gebrek met gevolglike verhoogde afhanklikheid van aminosure vir energieproduksie.



Figuur 4.5.6 Verspreidingskurwes van die orotiensuurkonsentrasies van pasiënte wat abnormale vetsuur metaboliete vertoon het

4.5.7 Ander aangebore metaboliese defekte

Veskeie ander aangebore metaboliese defekte is in die tydperk van die studie opgespoor wat insluit mukopolisakkariedoses, oligosakkariedoses en glikoproteïenabnormaliteite. Soos te verwagte het die groep pasiënte min of geen verhoogde orotiensuurkonsentrasies vertoon nie.

Hoofstuk 5

GEVOLGTREKKINGS EN BESPREKING

5.1 PROBLEEMSTELLING

Die primêre doel van die studie was om te bepaal wat is die effektiwiteit van orotiensuurbepaling as 'n eenvoudige siftingstoets. Aangesien orotiensuur nie slegs verhoog in die geval van defekte van die primidienmetabolisme nie maar ook tydens verhoging van ammoniak wou dit voorkom of die toets baie effektief aangewend kan word. 'n Groot verskeidenheid defekte word gekenmerk aan verhoogde ammoniakvlakke wat aan verskeie redes toegeskryf word.

5.2 BENADERING

In hierdie studie is 'n minder tradisionele benadering gevolg deurdat die kontrolegroep pasiënte was waarby geen metaboliese defekte opgespoor kon word nie en nie 'n groep klinies normale persone nie. Hierdie benadering was belangrik aangesien dit die presiese omstandighede simuleer waaronder die toets gebruik gaan word. Die eksperimentele groep pasiënte was pasiënte waarby abnormailteite opgespoor was. Al dié pasiënte was nie noodwendig gediagnoseer nie. By 'n groot hoeveelheid was daar wel 'n diagnose van 'n bekende metaboliese defek gemaak..

Verskeie faktore het 'n invloed op die uitskeiding van orotiensuur en is in ag geneem tydens berekening van die effektiwiteit en sensitiwiteit van die

toets. Die invloed van medikasie (valproaat, antibiotika en parasetamol) wat die meeste gebruik word in die groep pasiënte wat in die studie betrek is, is ondersoek en daar is gevind dat die medikasie geen of 'n baie klein invloed op die uitskeiding van orotiensuur het. Hierdie groep pasiënte is verwyder uit die abnormale groep wat reeds die sensitiviteit van die tegniek verbeter het met ongeveer 3%. Meerdere medikasie mag hier betrokke wees maar alle inligting word egter nie altyd van al die pasiënte ontvang nie en alle medikasie is nie altyd opspoorbaar met behulp van die tegnieke wat uitgevoer word nie. Ander medikasie mag dus 'n invloed hê wat nie hier in aanmerking geneem is nie.

Daar was 'n duidelike verwantskap tussen die uitskeiding van orotiensuur en die ouderdom van pasiënte. Hoë uitskeiding kom voor kort na geboorte met 'n vinnige afname in die konsentrasies tot ongeveer op 'n ouderdom van 2 jaar. Effens hoër konsentrasies word weer waargeneem by pasiënte van ongeveer 60 jaar. Op grond van die waardes is die pasiënte verdeel in 3 groepe. Groep 1 was pasiënte onder die ouderdom van 2 jaar, groep 2 pasiënte tussen die ouderdom van 2 en 6 jaar en groep 3 ouer as 6 jaar. Die verdeling van die pasiënte volgens ouersomgroepe verbeter die effektiwiteit van die siftingstoets, hoewel die effektiwiteit steeds nie binne aanvaarbare grense van ongeveer 80% is nie. Baie metaboliese defekte lei egter nie tot verhoogde orotiensuur nie, maar is ingesluit in die eksperimentele groepe. Die moontlikheid bestaan dat die defekte wat wel tot verhoogde orotiensuur lei wel effektief geïdentifiseer kon word.

Die abnormaliteite wat verantwoordelik is vir die uitskeiding van verbindings wat dikwels verhoog by babas voorkom beïnvloed ook op die uitskeiding van orotiensuur. Die verhoging van orotiensuur by babas met 'n oorganklike babaprofiel is waarskynlik toe te skryf aan 'n toestand wat beskryf word as oorganklike hiperammonemia. Hierdie "defek" word nie as 'n metaboliese defek aanvaar nie, maar dit bemoelijk wel die onderskeid tussen normale babas en babas met metaboliese defekte.

5.3 FINALE GEVOLGTREKKINGS

Hierdie studie is uiters suksesvol afgehandel hoewel die resultaat minder bevredigend is as wat voor gehoop is. Uit die resultate blyk dit duidelik dat die bepaling van orotiensuur tydens die opsporing van orotiensuururie sowel as ureumsiklusdefekte suksesvol aangewend kan word, maar vir al die ander defekte moet daar groot versigtigheid aan die dag gelê word.

Defekte van die koolhidraatmetabolisme, veral glikogeenstoringsdefekte en galaktosomie toon in ongeveer 50% van die gevalle wel verhoogde vlakke orotiensuur. Die verhoging is waarskynlik afhanklik van lae koolhidraatinname met gevolglike verhoging van aminosuorkatabolisme. Omrede die verhoging van orotiensuurvlakke nie konstant is nie, en kan die toets nie aangewend word as 'n betroubare siftingstoets nie, kan dit nogtans waardevolle inligting verskaf indien die kliniese beeld in ag geneem word en as ander siftingstoets ook uitgevoer word.

Defekte van die lisienmetabolisme soos ureumsiklusdefekte se orotiensuuruitskeiding is gewoonlik hoog. Tirosienmetabolisme defekte het op 'n gereelde basis verhoogde vlakke getoon maar hierdie verhoogde orotiensuurkonsentrasies kon nie met behulp van GC-MS bevestig word nie. Die verhoogde orotiensuurvlakke was vals positiewe waardes, waarskynlik as gevolg van die verhoging van histidien wat dikwels tydens algemene aminosuururie teen verhoogde konsentrasies in uriene aangetref word. Die bydrae van orotiensuurbepaling as 'n siftingstoets vir aangebore metaboliese defekte van die aminosuurmetabolisme is waarskynlik beperk tot lisien-proteïenintoleranasie en hiperlisienemie.

Vetsuorkataboliese defekte soos in die geval van koolhidraatdefekte het ongeveer in 50% van die monsters wat ontvang is verhoogde vlakke

orotiensuur vertoon. Hierdie verhoogde vlakke is duidelik 'n sekondêre effek van die defekte wat afhanklik is waarskynlik van lewerskade en/of dieet. Die opsporing van die defekte met behulp van orotiensuur sal dus nie konstant wees nie omrede indien die lewerskade nog nie ernstig is nie of as die inname van koolhidrate verhoogde proteïenkatabolisme voorkom sal die defekte nie opspoorbaar wees nie. Hoewel die bepaling van orotiensuur nie as 'n siftingstoets vir die defekte gebruik kan word nie verskaf dit tog waardevolle antwoorde. Veral by die ouer groep pasiënte is verhoogde orotiensuur opgemerk by pasiënte met karnitiengebreek. Dit is nie bekend of die pasiënte 'n primêre of sekondêre karnitiengebreek gehad het nie, maar die verhoging van orotiensuur en verlaging van vrye karnitien kan aanduidend wees van 'n intra-sêllure karnitiengebreek met gevolglike verhoogde afhanklikheid van aminosure vir energieproduksie.

Organiese-suurmetabolisme veral propioonasidemie defekte het ten spyte van bekende verhoogde ammoniakvlakke nie verhoogde orotiensuurvlakke vertoon nie. Die tendens gaan waarskynlik gepaard met die oorsaak van hipperammonemie by die defekte. Verskeie outeurs het gevind dat propioonsuur en waarskynlik N-propionielglutamiensuur, wat by die defekte voorkom, karbamoïelfosfaatsintetase inhibeer. Die verhoogde ammoniak vlakke by die pasiënte is dus nie 'n gevolg van verhoogde karbamoïelfosfaat nie, en dus ook nie orotiensuur nie. Die waarneming in die studie dat pasiënte met organiese suurmetabolisme defekte nie orotiensuur uitskei nie kan 'n interessante toepassing vir die orotiensuur bepaling daar stel. Indien pasiënte wel verhoogde bloed ammoniakvlakke toon maar die orotiensuurvlakke blyk normaal te wees dui dit op 'n moontlike organiese suurmetabolisme defek. Dieselfde reël geld ook vir aangebore defekte van die sintese van karbamoïelfosfaat

'n Uitsondering by bogenoemde is pasiënte met met meervoudige karboksilasedefek. Hierdie defekte is meestal as gevolg van defekiewe biotinidase en raak ook die ensiem pirovaatkarboksilase. Defekte van pirovaatkarboksilase was baie meer konstant opspoorbaar omrede die

inname van koolhidrate nie 'n invloed op energie produksie het nie (pirovaat kan nie omgeskakel word na oksaalasynsuur nie wat 'n direkte invloed op die Krebsiklus sowel as glukoneogenese het).

Mukopolisakkariedoses, oligosakkariedoses en glikoproteïenabnormaliteite het, soos verwag, min of geen verhoogde orotiensuurkonsentrasies vertoon en is die moontlikheid vir orotiensuurbepaling as siftingstoets vir die defekte nie 'n moontlikheid nie.

5.4 Gebruik van referensiewaardes vir urinêre orotiensuurkonsentrasies.

Die bepaling van orotiensuur by orotiensuururie en veral ureumsiklusdefekte speel 'n belangrike rol by die identifisering van die defekte. Bykans al die pasiënte wat in die studie opgespoor is het tydens die akute fase van die defek orotiensuur uitgeskei wat 20 keer hoër was as die normale uitskeiding en kon dus maklik met die tegniek identifiseer word. In die opsig is die tegniek veral belangrike vir die oposporing van OTC. Dit wil egter voorkom of die tegniek slegs aangewend sal kan word tydens die akute fase of as 'n allopurinolbelading uitgevoer word. Daar kan dus met geen sekerheid beweer word dat die tegniek alle OTC pasiënte sal kan identifiseer nie. Op grond van die resultate van die studie kan egter aanbeveel word dat orotiensuurkonsentrasies hoër as 50 mmol/mol kreatinien (ongegag die ouderdom) as 'n potensiële orotiensuururie of ureumsiklus gesien moet word. Hierdie resultaat moet in die lig van die gevare van hiperammonemie dringend opgevolg word met bloedammoniak annalises sowel as maatreëls om die ammoniakvlakke te verlaag. Natriumbesoaat en arginien kan vir die doel aangewend word. Verdere analises moet uitvoer word om die spesifieke defek te identifiseer. Organies suuranalises en aminosuuranalises sal in die geval die vinnigste en mees betroubaarste resultate verskaf.

Pasiënte met glikogeenstoringsdefekte, tirosienemie en het in die studie dikwels ook verhoogde orotiensuurvlakke (20-50 mmol/mol kreatinien vir 0 tot 2 jaar,) vertoon. Hierdie defekte word selde by ouer pasiënte gesien, maar 'n 2 tot 5 voudige verhoging by die ander oudersomsgroepe kan moontlik gebruik word as aanduidend van een van bogenoemde defekte. Urinêre orotiensuurvlakke in die orde moet dus opgevolg word met koolhidraat- en tirosienanalises. Hierdie toepassing is reeds vir die afgelope aantal maande in die laboratorium te Potchefstroom toegepas met uitstekende gevolge.

Verhoogde orotiensuurvlakke, 20-50 mmol/mol kreatinien (oudersomsgroep 0-2 jaar) in kombinasie met verhoogde laktaat mag moontlik dui op 'n meervoudige karboksilase of pirovaatkarboksilase defek. Hoewel die aspek nie in die studie nagegaan is nie behoort die inname van glukose deur die pasiënte nie 'n beduidende invloed op die orotiensuuruitskeiding te hê nie.

Defekte van die vetsuurmetabolisme en veral langketting-hidroksiasiel-KoA-dehidrogenase defek het dikwels tot verhoogde orotiensuurvlakke aanleiding gegee. Anders as ander defekte kom die defekte ook dikwels voor by kinders ouer as 2 jaar en kan verwag word dat koolhidraatinname die uitskeiding van orotiensuur sal verlaag. Die meeste pasiënte met 'n vetsuurmetabolisme defek het 'n 3 tot 3 voudige verhoogde orotiensuuruitskeiding vertoon. Hierdie waarde sal moeilik onderskeibaar wees van koolhidraatmetabolisme en melksuurmetabolisme defekte. 'n Proses van eliminasië kan egter gevolg word. Verhoogde orotiensuur met normale melksuur en koolhidraat uitskeiding moet moontlik opgevolg word met lipiedmetaboliese defek ondersoek.

Hoewel organiese suurmetsbolisme defekte nie aanleiding gee tot verhoogde urinêre orotiensuurvlakke nie, kan die analises nogtans waardevolle inligting gee. Verhoogde ammoniak met normale orotiensuuruitskeiding kan moontlik dui op propioonsuururie, metielmaloonsuururie of isovaleriaansuururie. CPT I (Karnities palmitoïeltranseferase) defek sal met dieselfde beeld presenteer. Veral in laasgenoemde geval sal die inligting waardevolle bydrae tot identifisering van die defek lei.

Hoewel die tegnieke vir die bepaling van urinêre orotiensuur sowel as die interpretasie van die resultate nie foutloos is nie kan die tegniek 'n groot bydrae lewer vir die opsporing van defekte sowel as bepaling vir opvolgtoetse. Die kriteria soos voorgestel in die studie, kan toegepas word en aanpassings kan gemaak word na gelang van ondervinding. Die tegniek is egter nie haalbaar vir persone sonder laboratoriumondervinding nie en meer navorsing behoort gedoen te word om die tegniek te vereenvoudig. Die moontlikheid om die tegniek te vereenvoudig tot doopstokkies is nie uitgesluit nie.

BIBLIOGRAFIE

- AOYAMA, Y., WADA, M., MORIFUJI, M. 2001. Orotic acid added to casein, but not to egg protein, soy protein, or wheat gluten diets increases 1,2-diacylglycerol levels and lowers superoxide dismutase activities in rat liver. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65. p2166.**
- ADACHI, T., TANIMURA, A., ASAHINA, M. 1963. A colometric determination of orotic acid. J Vitaminol., 9:217-226.**
- ANDERSON, E.P. 1978. Uridine-cytidine kinase from murine neoplasm. (In Hoffee, P.A., Jones, M.E., ed. Methods in enzymology volume LI: Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. New York: Academic Press. P314 – 321.)**
- ADOLPH, K.J., FUNG, E., MCLEOD, D.R., MORGAN, K., SNYDER, F.F. 1991. Dihydropyrimidine dehydrogynase deficiency in a Hutterite newborn. (In Harkness, R.A., Elion, G.B., Zöllner, N., ed. Advances in experimental medicine and biology vol. 309B Purine and pyrimidine metabolism in man VII Part B: Structural biochemistry, pathogenesis, and metabolism. New York: Plenum Press. P311 – 314).**
- ASAI, M., SUMI, S., KIDOUCHE, K., IMAEDA, H., TOGARI, H., WADA, Y. 2000. Urinary pyrimidine analysis in healthy newborns, infants, children, adults and patients with congenital metabolic deseases. Pediatr. Int., 42. p499.**
- BACHMANN, C., COLOMBO, J.P. 1980. Diagnostic value of orotic acid excretion in heretable disorders of the urea cycle and in hyperammonemia due to organic acidurias. Eur. J. Pediatr., 134. p109.**

BACHMANN, C., COLOMBO, J.P., BERUTER, J. 1979. Short chain fatty acids in plasma and brain. Quantitative determination by gas chromatography. Clin. Chim. Acta 92. p153.

BACHMANN, C., KRÄHENBÜHL, S., COLOMBO, J.P., SCHUBIGER, G., JAGGI, K.H., TÖNZ, O. 1981. N-Acetylglutamate synthetase deficiency: a disorder of ammonia detoxification. N. Engl. J. Med., 304. p543.

BATSHAW, M.L., BRUSILOW, S.W. 1978. Asymptomatic hyperammonemia in low birthweight infants. Pediatr. Res., 12. p221.

BEARDMORE, T.D., KELLY, W.N. 1971. Ultraviolet-absorbing compounds in urine from patients with hereditary disorders of purine and pyrimidine metabolism. Clin. Chem. 17:795.

BELLINGER, J.F., BUIST, N.R.M. 1971. Rapid column-chromatographic measurement of orotic acid. Clin. Chem., 17:1132-1133.

BONO, V., WEISSMAN, S., FREI, E. The effect of 6-azauridine administration on de novo pyrimidine production in chronic myelogenous leukemia. J Clin. Invest. 43:1486, 1964.

BRESNICK, E. 1978. Deoxythymidine kinase in regenerating rat liver. (In Hoffee, P.A., Jones, M.E., ed. Methods in enzymology volume LI: Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. New York: Academic Press. P360 – 365.)

BROWN, P.R. 1973. High pressure liquid chromatography: Biochemical and biomedical applications. New York: Academic Press. p44-46 .

BRUSILOW, S., MAESTRI, N.E. 1996. Urea cycle disorders: diagnosis, pathophysiology, therapy. Adv. Pediatr., 43. p127.

CHENG, Y.C . 1978. Thymidine kinase from blast cells of myelocytic leukaemia. (In Hoffee, P.A., Jones, M.E., ed. Methods in enzymology volume LI: Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. New York: Academic Press. P365 - 371.)

COLEMAN, P.F., SUTTLE, D.P., STARK, G.R. 1978. Purification of a multifunctional protein bearing carbamyl-phosphate sythetase, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase enzyme activities from mutant hamster cells. (In Hoffee, P.A., Jones, M.E., ed. Methods in enzymology volume LI: Purne and pyrimidine nucleotide metabolism. New York: Academic Press. P121 – 134).

COLLIP, P. 1987. Orotic acid, inosine and nucleosides in the treatment of degenerative retinal diseases: a double blind study. Curr. Ther. Res., 42. p235.

CHRISTOPHERSON, R.I., FINCH, L.R. 1977. The assay of orotate by an isotope dilution procedure. Anal. Biochem., 80:159-167.

DILEEPAN, K.N., KENNEDY, J. 1983. Rapid conversion of newly-synthesized orotate to uridine-5-monophosphate by rat liver cytosolic enzymes. FEBS Lett. 153. p1.

DRY, J. 1994. Methods for the detection and diagnosis of inborn errors in the purine and pyrimidine metabolism. Potchefstroom: PU vir CHO (Verhandeling - MSc). p56 .

ENGELHART, H. 1979. High performance liquid chromatography: chemical laboratory practice. New York: Springer-Verlag. p42-43 .

FALLON, H.J., FREI, E., BLOCK, J., SEEGMILLER, J.E. 1961. The uricosuria and orotic aciduria induced by 6-azauridine. J Clin. Invest., 40:1906-1914.

FESSAS, P., PAPADAKIS, D., ROMBOS, Y., TASSIOPOULOS, T. Hereditary orotic aciduria (uridine monophosphate synthase deficiency) in an adult: The broadening spectrum of a rare disorder. (In Bartsocas, C., Loukopoulos, D. eds: Genetics of Hematological Disorders, New York, Hemisphere, 1992, p103).

FIORAVANTI, A., FLAVIANI, M., GAMBELUNGHE, C., MICHELETTI, A., SPOSITO, M., RUFINI, S. 1997. High-performance liquid chromatography determination of orotic acid as its methyl derivative in human urine. J. Chromatogr. B 703. p263.

GALJAARD, H. 1980. Genetic metabolic diseases. Early diagnosis and prenatal analysis. Amsterdam: Elsevier/North-Holland biomedical Press. P426, 747, 418 – 420 .

GEISS, K.R., STERGIU, N., NEUENFELD, H.U., JESTER, H.G. 1988. Effects of magnesium orotate on exercise tolerance in patients with coronary heart disease. Cardiovascular Drugs Ther., 12. p153.

GLASGOW, A.M. 1982. A new method for measuring urinary orotic acid. Am. J. Clin. Pathol., 77. p452.

GRZELKOWSKA, K., MOTYL, T., OSTROWSKI, J., TRZECIAK, L. 1995. The effect of OA on proliferation and polyamine metabolism of K 562 leukemic cells and their responsiveness to natural killer cell activity. Int. J. Hematol. 61. p147.

- HARRIS, M.L., OBERHOLZER, V.G. 1980. Conditions affecting the colorimetry of orotic acid and orotidine in urine. Clin. Chem., 26. p473.**
- HASSAN, A.S., MILNER, J.A. 1981. Alterations in liver nucleic acids and nucleotides in arginine deficient rats. Metabolism 30. p739.**
- HINKEL, G.K., KINTZEL, H.W., SCHWARZE, R. 1972. Prevention of hyperbilirubinemia in premature and newborn infants using orotic acid. Dtsch. Gesundheitsw. 27. p2414.**
- HUNTER, A. 1965. The application to urine of a bromine method for the determination of histidine. Clin. Chim. Acta 12:2-16.**
- ITO, T., VAN KUILENBURG, A.B., BOOTSMAN, A.H., HAASNOOT, A.J., VAN CRUCHTEN, A., WADA, Y., VAN GENNIP, A.H. 2000. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. Clin. Chem., 46. p445.**
- JONES, M. 1971. Regulation of pyrimidine and arginine biosynthesis in mammals, in Advances. (In Weber G. ed: Enzyme Regulations, New York, Pergamon Press, p 19.**
- KABATA, A., SUZUOKI, J., KIDA, M. 1962. Acid-soluble nucleotides of milk. I. Quantitative and qualitative differences of nucleotide constituents in human and cow milk. J Biochem., (Tokyo) 51:277.**
- KELLEY, W.N., WYNGAARDEN, J.B. 1971. Drug treatment of gout. Semin. Drug Treat. 1. p119.**

KELLEY, W. Hereditary orotic aciduria. (In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., eds; The Metabolic Basis of Inherited Disease, New York, McGraw-Hill, 1983, p 1202).

KOKKINAKIS, D.M., ALBORES-SAAVEDRA, J. 1994. Orotic acid enhancement of preneoplastic and neoplastic lesions induced in the pancreas and liver of hamsters by N-nitroso-2-hydroxy-propyl) (2-oxopropyl)amine. Cancer Res. 54. p5324.

LOTZ, M., FALLON, H.J., SMITH, L.H., JR. 1963. Excretion of orotic acid and orotidine in heterozygotes of congenial orotic aciduria. Nature (Lond.) 197:194.

MILLER, R.W. 1978. Dehydroorotate dhydrogenase (Neurospora). (In Hoffee, P.A., Jones, M.E., ed. Methods in enzymology volume LI: Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. New-York:Academic press. P63 – 69).

MULLER, G. 1984. Metabolic effects of orotic acid. Z. Gesamte Inn. Med., 39. p269.

OHBA, S., KIDOUCI, K., NAKAMURA, C., KATOH, T., KOBAYASHI, Y., WADA, Y. 1991. Reference values of orotic acid, uracil and pseudouridine in urine. Adv. Exp. Med. Biol., 309B. p27.

OHBA, S., KIDOUCI, K., NAKAMURA, C., KATOH, T., KOBAYASHI, Y., WADA, Y. 1991. Automated determination of orotic acid, uracil and pseudouridine in urine by high-performance liquid chromatography with column switching. J. Chromatogr., 568. p325.

OKONKOVO, P.O., KINSELLA, J.E. (1969). Orotic acid in food milk powders. American J clin. Nut., 22:532.

RAO, P.M., NAGAMINE, Y., ROOMI, M.W., RAJALAKSHMI, S., SARMA, D.S. 1984. Orotic acid, a new promoter for experimental liver carcinogenesis. Toxicol. Pathol. 12. p173.

ROGER, L.E., PORTER, F.S. 1968. Hereditary orotic aciduria II: a urinary screening test. Pediatrics 42. p423.

ROSENBLOEM, F.M., SEEGMILLER, J.E. 1964. An enzymatic spectrophotometric method for determination of orotic acid. J. Lab. Clin. Med. 63:492-500.

SKOOG, D.A., WEST, D.M., HOLLER, F.J. 1992. Fundamentals of analytical chemistry. Sixth edition. Fort Worth, Saunders College Publishing. p514-515, 561-564, 713, 716-718.

SMITH, L.H., JR., HUGULEY, C. M., JR., BAIN, J.A. 1972. Hereditary orotic aciduria (In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., eds; The Metabolic Basis of Inherited Disease, New York, McGraw-Hill, 1983, p 1003).

SMITH, L.J. Pyrimidine metabolism in man. New England Medical Journal 238:764, 1973.

SUMI, S., KIDOUCHI, K., IMEADA, M., ASAI, M., ITO, T., WADA, Y. 1977. Urinary orotic acid in healthy adults and patients with various deseases. Clin. Chim. Acta, 266. p195.

SUMI, S., KIDOUCI, K., OHBA, S., WADA, W. 1995. Automated screening system for purine and pyrimidine metabolism disorders using high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr., 672. p233.

SUTTLE, D.P., BECROFT, D.M.O., WEBSTER, D.R. 1989. Hereditary orotic aciduria and other disorders of pyrimidine metabolism. (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, Inc. p1095 – 1097, 1101 – 1103).

TSUJI, K. 1961. A new color reaction for the identification and determination of orotic acid. J. Pharm. Soc. Jpn., 81. p1655.

VALLE, D., SIMELL, O. 1989. The Hyperornithinemias. (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, Inc. p1173 – 1176).

VANDAMME, E.J. 1992. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. J. Chem. Technol. Biotechnol. 53. p313.

VAN DER WEYDEN, M.B., COOPER, M., FIRKIN, B.G. 1979. Altered erythrocyte pyrimidine activity in vitamin B12 or folate deficiency. Br. J. Haematology, 42. p85.

VAN GENNIP, A.H., BUSCH, S., SCHOLTEN, E.G., STROMER, L.E., ABELING, N.G. 1991. Simple method for the quantitative analysis of dihydropyrimidines and N-carbamyl- β -amino acids in urine. (In Harkness, R.A., Elion, G.B., Zöllner, N., ed. Advances in experimental medicine and biology vol. 309B Purine and pyrimidine metabolism in man VII Part B: Structural biochemistry, pathogenesis, and metabolism. New York: Plenum Press. P15 – 19).

VAN GENNIP, A.H., VAN NOORDENBURG-HUISTRA, D.Y., DE BREE, P.K., WADMAN, S.K. 1978. Two-dimensional thin-layer chromatography for the screening of disorders of purine and pyrimidine metabolism. Clin. Chim. Acta, 86. p7.

VAN GENNIP, A.H., GRIFT, J., DE BREE, P.K., ZEGERS, B.J., STOOP, J.W., WADMAN, S.K. 1979. Urinary excretion of orotic acid, orotidine and other pyrimidines in a patient with purine nucleoside phosphorylase deficiency. Clin. Chim. Acta, 93. p419.

VAN GENNIP, A., VAN BREE-BLOM, E., GRIFT, J., DE BREE, P., WADMAN, S. 1980. Urinary purines and pyrimidines in patients with hyperammonemia of various origins. Clin Chim Acta, 104, p227.

VREKEN P, VAN LINT AE, BOOTSMA AH, OVERMARS H, WANDERS RJ, VAN GENNIP AH. 1998. Rapid stable isotope dilution analysis of very-long-chain fatty acids, pristanic acid and phytanic acid using gas chromatography-electron impact mass spectrometry. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. Aug 25;713(2):281-7.

VREKEN, P., VAN KUILENBURG, A.B., HAMAJIMA, N., MEINSMAN, R., VAN LENTHE, H., GOHLICH-RATMANN, G., ASSMANN, B.E., WEVERS, R.A., VAN GENNIP, A.H. 1999. cDNA cloning, genomic structure and chromosomal localization of the human BUP-1 gene encoding beta-ureidopropionase. Biochim. Biophys. Acta , 1447. p251.

WEISSMAN, S.M., EISEN, A.Z., FALLON, H., LEWIS, M., KARON, M. 1962. The metabolism of ring-labeled orotic acid in man. J clin. Invest., 41, p1546.

WEVERS, R.A., ENGELKE, U.F., MOOLENAAR, S.H., BRAUTIGAM, C., DE JONG, J.G., DURAN, R., DE ABREAU, R.A., VAN GENNIP, A.H. 1999. ¹H-NMR spectroscopy of body fluids: inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. Clin, Chem., 45. p539.

WOOD, M.H., O'SULLIVAN, W.J. 1973. The orotic aciduria of pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 116. p57.

YAMADA, E.W. 1978. Uridine phosphorylase from rat liver. (In Hoffee, P.A., Jones, M.E., ed. Methods in enzymology volume LI: Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. New York: Academic Press. P423 - 431.)