

DEFEKTE TETRAHIDROBIOPTERIEN- HOMEOSTASE IN 'N SWART FAMILIE MET HIPERFENIELALANIENEMIE

deur

NICOLEEN POTGIETER

Hons. B.Sc.

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes
vir die graad Magister Scientiae (Biochemie met spesialisering in
Bioteegnologie) aan die Potchefstroomse Universiteit
vir Christelike Hoër Onderwys.

Studieleiers : Prof. W.J. de Wet
Mnr. E. Erasmus

Potchefstroom
Mei 1993

*A Man would do nothing, if he waited until
he could do it so well that no one would
find fault with what he has done.*

CARDINAL NEWMAN

Aan Pieter.....

ABSTRACT

Defective Tetrahydrobiopterin Homeostasis in a Black Family with Hyperphenylalaninemia

(Original title : Defekte Tetrahydrobiopterien-homeostase in 'n Swart Familie met Hiperfenielalanienemie)

In 1984 the Department of Biochemistry of the Potchefstroom University for Christian Higher Education introduced a metabolic screening programme. Results from a two year research project on defective amino acid metabolism of 1443 clinically selected patients are presented.

Utilization of a dual screening approach consisting of one-dimensional thin layer chromatography and automatic amino acid analysis led to the identification of various abnormalities associated with known metabolic defects. Seven different types of amino acidurias were diagnosed in a total of 15 positively tested patients. Hyperphenylalaninemia accounted for 5 of the amino acidurias of which one was a very rare case of malfunctional phenylalanine metabolism. Amongst the total screened group, atypical ninhydrin positive components were found in approximately 13 % of the analyzed urine samples. It was not possible to link the presence of these components to any known defect of the amino acid metabolism.

Given that the presence of the atypical ninhydrin positive components complicates the interpretation of laboratory results, it was necessary to investigate their nature and origin. Different separation techniques were applied in an attempt to isolate the metabolites responsible for the atypical ninhydrin colour complexes. However, it was not possible to isolate these metabolites using the normal protocol for isolation of amino acids. This led to the conclusion that their physico-chemical properties did not correspond with that of known amino acids. GC-MS analysis indicated structural

similarities between these atypical compound(s) and amino acid conjugates associated with some organic acidurias. Analysis of a consignment of samples obtained from newborns on antibiotic treatment focused the attention on medication as possible cause of the atypical ninhydrin positive components. GC-MS analysis indicated the presence of a metabolite of the penicillin molecule in the urine of patients receiving antibiotics. These results were confirmed by a penicillin loading test on a healthy individual.

Hyperphenylalaninemia (HPA) is not prevalent in Negroids. Therefore, the case of a black baby girl with HPA discovered during this study was exceptional. Using a dual screening procedure, elevated levels of phenylalanine were detected in different plasma specimens of the patient. The extent of the elevation was such that it could not be associated with phenylketonuria (PKU), but rather a variant of the disease. An approach investigating the disease on metabolite as well as enzyme level was formulated. A tentative diagnosis was made on the overall status of metabolites in the phenylalanine hydroxylase system, after which the diagnosis was confirmed by enzymatic analysis.

Metabolite analyses revealed the presence of phenolic compounds in the patient's urine. A phenylalanine loading test indicated that the clearance rate of the excess phenylalanine from the patient's bloodstream was impaired. However, her phenylalanine levels did not rise as much as commonly expected in the case of PKU. Although this result was indicative of a tetrahydrobiopterin-defect (BH_4), the patient did not react positively to the administration of 20 mg BH_4 /kg mass. The patient's excretion pattern of urinary pterines, as well as her low levels of active BH_4 were consistent with a DHPR-defect. The reduced levels of neurotransmitter metabolites in cerebrospinal fluid of the patient also indicated a DHPR-defect.

Information obtained from the metabolite analyses indicated DHPR-defect as the possible cause of hyperphenylalaninemia in the patient. This diagnosis was confirmed when no DHPR-activity could be demonstrated in dried blood spots from the patient. Given that the patient did not react to a high dose of 20 mg BH_4 per kilogram of

weight, the disorder is referred to as **non-responsive dihydropteridine reductase deficiency**. The patient described here is not only the second case of non-responsive DHPR-defect in the world, but also the **first black patient** diagnosed with this disease.

Contributions from facets of this research have been presented at the following local congresses :

Screening for Metabolic Defects in South Africa

CANN, N., KRUGER, N., KNOLL, D.P., WILLEMSE, R., ERASMUS, E. & MIENIE, L.J.

Tenth Congress of the South African Biochemical Society, Pietermaritzburg, January 1991.

A Black Family with PKU

KRUGER, N., ANNANDALE, S., KNOLL, D.P., ERASMUS, E., CANN, N., MIENIE, L.J., & DE WET, W.J.

Human Genetics Congress, Vereeniging, March 1991.

OPSOMMING

Die Departement Biochemie aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys onderneem sedert 1984 'n siftingsprogram vir die opsporing van metaboliese siektetoestande. Navorsingsresultate van 'n tweejaar periode wat defekte aminosuurmetabolisme by 1443 klinies geselekteerde pasiënte ondersoek het, word hier aangebied.

Met behulp van 'n tweeledige siftingsprotokol wat eendimensionele dunlaagchromatografie en outomatiese aminosuuranalise behels het, is verskeie abnormaliteite wat met bekende metaboliese defekte geassosieer word in hierdie periode waargeneem. Sewe verskillende defekte van die aminosuurmetabolisme is by altesaam 15 pasiënte gediagnoseer. Behalwe dat hiperfenielalanienemie die hoogste insidensie getoon het, is 'n hoogs uitsonderlike geval van hierdie siektetoestand ook opgespoor. Verder is atipiese ninhidrien positiewe komponente wat nie met bekende defekte van die aminosuurmetabolisme geassosieer word nie, in ongeveer 13 % van die urienmonsters aangetref.

Aangesien die teenwoordigheid van atipiese ninhidrien positiewe komponente die interpretasie van laboratoriumresultate bemoeilik, is die aard en oorsprong daarvan ondersoek. Verskillende skeidingstegnieke is aangewend in 'n poging om die verbinding(s) wat vir die ontstaan van die atipiese ninhidrien positiewe komponente verantwoordelik is, te isoleer. Die betrokke verbinding(s) kon egter nie saam met die aminosure geïsoleer word nie en gevolglik is die afleiding gemaak dat die fisies-chemiese eienskappe daarvan nie met dié van bekende aminosure ooreenstem nie. GC-MS - analise het daarop gedui dat hierdie atipiese verbinding(s) strukturele ooreenkomste met konjugaatmetaboliete wat met sommige organiese suururieë geassosieer word, toon. 'n Besending monsters afkomstig van pasgebore babas op antibiotikabehandeling het die aandag op medikasie as oorsaak van die atipiese ninhidrien positiewe komponente gevestig. 'n Gedeelte van die penisillinemolekule

is met behulp van GC-MS in die uriene van pasiënte op antibiotikabehandeling opgespoor. Die resultate is deur middel van 'n penisillinebelading op 'n gesonde proefpersoon bevestig.

Hiperfenielalanienemie kom nie algemeen by Negroïede voor nie en gevolglik was die geval van 'n swart babadogtertjie met HPA wat tydens hierdie studie opgespoor is, uitsonderlik. Met behulp van die tweeledige siftingsprosedure is verhoogde fenielalanienvlakke in verskillende opeenvolgende plasmamonsters waargeneem. Die mate van die verhoging was van so 'n aard dat dit nie met fenielketonurie (PKU) geassosieer is nie, maar eerder op 'n variante vorm van die siektetoestand gedui het. 'n Benaderingswyse wat die siektetoestand op metaboliet- sowel as ensiemvlak ondersoek, is geformuleer. Op dié wyse is 'n voorlopige diagnose op grond van die algehele status van metaboliete in die fenielalanienhidroksilasesisteen gemaak. Die voorlopige diagnose is daarna met 'n ensiematiese analise bevestig.

Met behulp van die metabolietanalises is vasgestel dat fenoliese komponente in die pasiënt se uriene teenwoordig was. Verder het 'n fenielalanienbelading aangetoon dat die eliminerings tempo van die oormaat fenielalanien uit haar bloedstroom verlaag was, maar dat haar fenielalanienvlakke tydens die belading nie so hoog soos dié van PKU-pasiënte gestyg het nie. Alhoewel bogenoemde resultaat op 'n tetrahydrobiopterien-gebrek (BH_4) gedui het, het die pasiënt nie op die toediening van 20 mg BH_4 /kg liggaamsmassa gereageer nie. Die pasiënt se urinêre uitskeidingspatroon van pterienkomponente, asook die lae vlakke van aktiewe BH_4 het op 'n defek van die dihydropteridienreduktase-ensiem (DHPR) gedui. Die drasties verlaagde vlakke van senuwee-oordragstofmetaboliete in haar serebrospinale vloeistof het ook op 'n DHPR-defek gedui.

Die verskillende metabolietanalise het 'n defekte DHPR-ensiem as die moontlike oorsaak van HPA by die swart pasiënt uitgewys. Hierdie diagnose is bevestig toe geen DHPR-aktiwiteit in gedroogde bloeddruppels van die pasiënt aangetoon kon word nie. Aangesien die pasiënt nie op die toediening van 'n hoë dosis van 20 mg BH_4 /kg liggaamsmassa gereageer het nie, word daar na die betrokke

siektetoestand as **nie-responsiewe dihidropteridienreduktase-defek** verwys. Behalwe dat hierdie slegs die tweede geval van nie-responsiewe DHPK-defek in die wêreld is, is die pasiënt wat hier beskryf word ook die eerste swart pasiënt met die betrokke siektetoestand.

Bydraes voortspruitend uit gedeeltes van hierdie navorsing is by die volgende plaaslike kongresse gelewer :

Screening for Metabolic Defects in South Africa

CANN, N., KRUGER, N., KNOLL, D.P., WILLEMSE, R., ERASMUS, E. & MIENIE, L.J.

Tiende Kongres van die Suid-Afrikaanse Biochemiese Vereniging, Pietermaritzburg, Januarie 1991.

A Black Family with PKU

KRUGER, N., ANNANDALE, S., KNOLL, D.P., ERASMUS, E., CANN, N., MIENIE, L.J., & DE WET, W.J.

Mensgenetika Kongres, Vereeniging, Maart 1991.

INHOUDSOPGAW

HOOFSTUK 1

INLEIDING	1
-----------------	---

HOOFSTUK 2

LITERATUURORSIG : DIE HIPERFENIELALANIENEMIE

2.1	INLEIDING	4
2.2	PROTEÏENE EN AMINOSURE	4
2.3	NORMALE METABOLISME VAN FENIELALANIEN	7
2.4	TETRAHIDROBIOPTERIEN	10
2.4.1	BH ₄ -homeostase	10
2.4.2	Biosintese van tetrahydrobiopterien	12
2.4.3	Regenerering van die kofaktor	13
2.4.4	Pteriene en die immuunrespons	14
2.5	DEFEKTE VAN DIE FENIELALANIENMETABOLISME	14
2.6	DIFFERENSIËLE DIAGNOSE	19
2.6.1	Die grondslag	19
2.6.2	Diagnose van klassieke PKU	20
2.6.3	Diagnose van BH ₄ -defekte	22
2.6.3.1	Fenielalanien	22
2.6.3.2	Pterienmetaboliete	23
2.6.3.3	Tetrahydrobiopterienbeladingstoets	24

2.6.3.4	Metaboliëte van senuwee-oordragstowwe	25
2.6.3.5	Toetsing van ensiemaktiwiteit	25
2.6.4	Prenatale diagnose	26
2.7	SAMEVATTING	27

HOOFSTUK 3

VOORKOMS VAN DEFEKTE VAN DIE AMINOSUURMETABOLISME BY 'N GROEP NEONATALE EN PEDIATRIESE PASIËNTE

3.1	INLEIDING	28
3.2	SIFTINGSPROSEDURES	30
3.2.1	Eendimensionele dunlaagchromatografie	30
3.2.2	Kwantitatiewe aminosuuranalise	36
3.3	RESULTATE VAN DIE SIFTINGSPROGRAM	42
3.4	WAARGENOME AMINOSUURURIEË	46
3.4.1	Histidienemie	46
3.4.2	Hiperornitienemie	47
3.4.3	Hiperlisienemie	50
3.4.4	Hipermetionienemie	51
3.4.5	Hartnup-siekte	51
3.4.6	Tirosienemie	53
3.4.7	Hiperfenielalanienemie	55
3.5	ATIEPIESE KOMPONENTE IN URIENMONSTERS	56
3.6	SAMEVATTING	57

HOOFSTUK 4

DIE EFFEK VAN PENISILLINE OP DIE ONTSTAAN VAN ATIPIESE NINHIDRIEN POSITIEWE KOMPONENTE

4.1	INLEIDING	60
4.2	EENDIMENSIONELE DUNLAAGCHROMATOGRAFIE EN KWANTITATIEWE AMINOSUURANALISE	60
4.3	DOWEX-ISOLERING VAN AMINOSURE	64
4.4	EKSTRAKSIE VAN ORGANIESE SURE	65
4.5	ISOLERING VAN DUNLAAGPOEIER WAT DIE ONBEKENDE KOMPONENT(E) BEVAT	67
4.6	KONJUGAATMETABOLIE AS MOONTLIKE OORSAAK VAN DIE ATIPIESE BANDE	69
4.7	MEDIKASIE AS OORSAAK VAN DIE ATIPIESE BANDE	72
4.7.1	Eendimensionele dunlaagchromatografie van 'n aantal antibiotikas	73
4.7.2	GC-MS - analise van 'n aantal antibiotikas	75
4.7.3	Ampisillienbelading op 'n proefpersoon	79
4.8	SAMEVATTING	81

HOOFSTUK 5

'N SWART FAMILIE MET HIPERFENIELALANIENEMIE

5.1	INLEIDING	83
5.2	FAMILIEGESKIEDENIS EN KLINIESE BEELD	85
5.3	METABOLIETANALISE	86
5.3.1	Fenielalanienbepalings	86
5.3.2	Metaboliëte van fenielalanien	87

5.3.3	Fenielalanienbeladings	91
5.3.4	BH ₄ -beladingstoets	94
5.3.5	Pterienmetaboliëte	99
5.3.6	Bepaling van hoeveelheid aktiewe BH ₄	107
5.3.7	Analise van serebrospinale vloeistof	109
5.3.7.1	Derivate van senuwee-oordragstowwe	109
5.3.7.2	Pterienmetaboliëte in serebrospinale vloeistof	111
5.3.7.3	Vlakke van fenielalanien en tirosien in serebrospinale vloeistof	112
5.4	BEPALING VAN DHPR-AKTIWITEIT	113
5.5	SAMEVATTING	118

HOOFSTUK 6

BESPREKING

6.1	SIFTING VIR DEFEKTE AMINOSUURMETABOLISME	120
6.2	ATIEPIESE NINHIDRIEN POSITIEWE KOMPONENTE	122
6.3	'N UITSONDERLIKE GEVAL VAN HIPERFENIELALANIENEMIE	124

BIBLIOGRAFIE	127
BYLAAG A	137
BYLAAG B	140
BEDANKINGS	144

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Aangebore metaboliese siektetoestande is die gevolg van 'n onvermoë om sekere komponente wat deur die dieet ingeneem word, te kataboliseer. Hierdie siektetoestande word veroorsaak deur 'n genetiese defek wat lei tot 'n gebrek in een of meer ensieme betrokke by die intermediêre metabolisme. Die gevolg van so 'n ensiemdefek is die opeenhoping van die substraat in die metaboliese sisteem, waar sodanige ensiem sy katalitiese funksie moet verrig. Die kliniese verloop van hierdie siektetoestande varieer aansienlik, maar dikwels het dit verstandelike vertraging of selfs die dood tot gevolg. Vroeë diagnose en geskikte behandeling, indien moontlik, is dus essensieel vir die voorkoming van ernstige kliniese simptome by geaffekteerde individue.

Defekte wat die normale metabolisme van koolhidrate, vetsure, organiese sure, aminosure, puriene en pirimidine affekteer en dus die opeenhoping daarvan in liggaamsvloeistowwe veroorsaak, ressorteer almal onder aangebore metaboliese siektetoestande. Wanneer defekte van die aminosuurmetabolisme tot die akumulasie van aminosure in liggaamsvloeistowwe lei, word daarna verwys as aminosuururieë of aminosuuremieë. Aminosuururieë word gedefinieer as 'n verhoogde konsentrasie van aminosure in die uriene, terwyl aminosuuremieë op verhoogde aminosuurvlakke in die bloed dui.

Die departement Biochemie aan die PU vir CHO het in 1984 'n siftingsprogram vir die opsporing van metaboliese siektetoestande van stapel gestuur. Daar is hoofsaaklik op die analise van organiese sure en aminosure gekonsentreer, maar toetsing van ander komponente wat 'n aanduiding van 'n metaboliese defek kan wees, soos reduserende stowwe, sulfiete, uriensuur en kreatinien is ook by die siftingsprogram geïnkorporeer. Die navorsing waaroor hierdie verhandeling handel, het sy oorsprong

gehad met my aanvanklike betrokkenheid by die opsporing van defekte van die aminosuurmetabolisme deur van 1D DLC- en HPLC-aminosuuranalises gebruik te maak.

Die probleemstelling van hierdie werk was om fisiologiese monsters van 'n groot aantal hoërisiko pasiënte vir defekte van die aminosuurmetabolisme te toets en 'n enkele geval in detail te bestudeer ten einde die spesifieke ensiemdefek by die pasiënt bloot te lê.

In Hoofstuk 3 word die tweeledige siftingsprotokol wat vir die analise van fisiologiese aminosuurinhoud gevolg is, uiteengesit. Die resultate van 'n tweejaarlange ondersoek word genoem en gevalle wat tot 'n finale diagnose gelei het, word kortliks bespreek. Daar word ook melding gemaak van twee ongewone verskynsels, wat tydens deelname aan die siftingsprogram na vore gekom het, naamlik die hoë voorkoms van atipiese ninhidrien positiewe komponente by urienmonsters en die geval van 'n swart babadogtertjie met hiperfenielalanienemie.

Aangesien die teenwoordigheid van atipiese ninhidrien positiewe komponente die interpretasie van laboratoriumresultate bemoeilik, kan dit tot vals positiewe of vals negatiewe bevindings lei. Verkeerde bevindings kan addisionele ondersoeke en onnodige behandeling in die geval van vals positiewe resultate tot gevolg hê of selfs tot ernstige kliniese toestande lei, indien behandeling as gevolg van negatiewe resultate weerhou word (Hill *et al.*, 1976). Die hoë voorkoms van hierdie atipiese komponente het die vraag laat ontstaan waaraan hierdie komponente hul oorsprong het en wat die aard daarvan is. In Hoofstuk 4 word die nodige aandag aan hierdie probleem gegee, met die volgende doelstellings voor oë :

- i) Isolاسie van die verbinding(s) wat vir die ontstaan van die atipiese ninhidrien positiewe komponente verantwoordelik is, deur van verskillende skeidingstegnieke gebruik te maak.
- ii) Aanwendig van 'n verskeidenheid analitiese tegnieke om die aard van die relevante verbinding na te gaan en moontlik te identifiseer.

Hiperfenielalanienemie is 'n algemene resessiewe toestand by Kaukasiërs, minder so by Mongloïede en is uitsonderlik by Negroïede (Scriver *et al.*, 1989). Hierdie groep siektetoestande is skynbaar skaars onder die Suid-Afrikaanse populasie (Op't Hof & Hitzeroth, 1987) en gevolglik was die geval van 'n swart babadogtertjie met hiperfenielalanienemie hoogs uitsonderlik. Weens die uitsonderlike aard van hierdie geval, vorm dit die kern van hierdie verhandeling en in die lig daarvan word die literatuuroorsig (Hoofstuk 2) tot die hiperfenielalanienemieë beperk. Die werking van die betrokke sisteem, asook die uitwerking van defekte op die homeostase daarvan word in hierdie hoofstuk verduidelik. Differensiële diagnose word ook breedvoerig bespreek.

Hoofstuk 5 beskryf 'n gedetailleerde studie van die swart dogtertjie se geval in 'n poging om die presiese aard van die hiperfenielalanienemie by die gesin vas te stel. Die doelstelling was om op 'n geordende wyse 'n reeks diagnostiese toetse op die pasiënt uit te voer ten einde 'n aanduiding van die moontlike ensiemdefek te kry, waarna die aktiwiteit van die betrokke ensiem getoets kon word om die diagnose te verifieer. Verder is die draerstatus van die ander gesinslede ook bepaal.

'n Opsomming van die belangrikste resultate word in Hoofstuk 6 gelys en die betekenis van die resultate word kortliks bespreek.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG : DIE HIPERFENIELALANIENEMIEË

2.1 INLEIDING

Defekte van die fenielalanienmetabolisme ressorteer onder **aangebore metaboliese afwykings**. Hierdie siektetoestande illustreer Garrod se vernaamste beginsel, naamlik dat **genetiese faktore** chemiese reaksies en gevolglik ook **biochemiese individualiteit** spesifiseer (Scriver & Clow, 1980). Die hiperfenielalanienemieë is 'n groep heterogene siektetoestande wat die gevolg van 'n verskeidenheid ensiemdefekte is en verskillende biochemiese manifestasies tot gevolg het.

Aangesien daar tydens hierdie studie deurgaans op die metaboliese aspekte van defekte van die aminosuurmetabolisme gefokus is, handel hierdie hoofstuk dan spesifiek oor die metaboliese aard van die hiperfenielalanienemieë. Die genetiese oorsake van HPA is deur Scriver en medewerkers (1989) gedokumenteër en vir verdere inligting word die leser na die betrokke werk verwys. Die hoofstuk bestaan uit 'n kort oorsig van proteïene en aminosure in die algemeen, waarna die aandag op fenielalanien gevestig word. Die verskillende komponente van die fenielalanienhidroksilasesisteem en die beginsels waarop differensiële diagnose gegrond is, word daarna in detail uiteengesit.

2.2 PROTEÏENE EN AMINOSURE

Volgens Evans (1983) maak proteïene maak sowat 17 % van die totale menslike liggaamsmassa uit. Die term proteïen is van die Griekse woord *proteios*, wat "eerste stand" beteken, afgelei. Hierdie naam dui direk die belangrikheid van proteïene aan. Proteïene is hoë molekulêre massa polipeptiede wat uit aminosure opgebou is, maar

ander nie-aminosuurgroepe, soos heem, suikers, lipiede, fosfaatgroepe en vitamieëne kan deel van komplekse proteïene uitmaak (Zubay, 1986; Murray *et al.*, 1988). Op grond van die rol wat hulle vervul kan proteïene as struktureel of funksioneel geklassifiseer word (Zubay, 1986). Die funksionele rol van proteïene sluit transport, regulering, katalise en kontraksie in, terwyl strukturele proteïene vorm en versterking aan die sel, asook die organisme in geheel verleen.

Proteïene moet eers tot aminosure, dipeptiede of tripeptiede verteer word voordat dit in die ingewande geabsorbeer kan word. Vertering van proteïene behels verskillende stappe, soos ekstraksie van die proteïen uit die voedsel, denaturering van die proteïen en hidrolise van die peptiedbindings om kleiner peptiede en vrye aminosure vry te stel (Newsholme & Leech, 1988). Absorpsie van dipeptiede en vrye aminosure vind in die jejunum en ilium plaas (Evans, 1983). Die vrye aminosure kan ensiematies na ander aminosure omgeskakel word of transaminase ondergaan, wat in die vorming van ammoniak en 'n ketosuur resulteer. Oksidasie van hierdie ketosure in die Krebs-siklus lei tot die generering van ATP, koolstofdioksied en water (Evans, 1983).

Elke proteïenmolekule is 'n polimeer van aminosure. Soos die naam aandui, besit aminosure beide 'n amino- en 'n karboksielsuur as funksionele groepe (Zubay, 1986). Die biologiese eienskappe van proteïene word grootliks bepaal deur die tipe aminosure wat daarin voorkom, die volgorde waarin hulle gebind is, asook hul ruimtelike oriëntasie ten opsigte van mekaar. Alhoewel daar ongeveer 300 verskillende aminosure in die natuur voorkom, kom slegs 20 hiervan in proteïene voor (Martin *et al.*, 1985). White *et al.* (1978) klassifiseer aminosure op grond van hul sykettings in drie groepe, naamlik :

- i) daardie met ioniese sykettings;
- ii) daardie met polêre, nie-ioniese sykettings, en
- iii) daardie met nie-polêre alifatiese of aromatiese sykettings.

Daar word ook tussen essensiële en nie-essensiële aminosure onderskei. Nie-essensiële aminosure kan in die liggaam gesintetiseer word, maar essensiële aminosure moet deur die dieet ingeneem word (Zubay, 1986).

Fenielalanien, waarvan die struktuur in Figuur 2.1 getoon word, is 'n aromatiese aminosuur met 'n molekulêre massa van 165.19 (Bremer *et al.*, 1981). Aangesien die menslike liggaam nie die vermoë besit om hierdie aminosuur self te sintetiseer nie, moet dit deur die dieet ingeneem word. Onder normale omstandighede benodig babas sowat 25 - 90 mg fenielalanien per kilogram liggaamsmassa per dag (Scriver *et al.*, 1989). Fenielalanien is onoplosbaar in etanol en relatief swak oplosbaar in water. By 20°C is die oplosbaarheid van fenielalanien 2.74 g per 100 g water. Die isoëlektriese pH van fenielalanien is 5.48 (White *et al.*, 1978). Fenielalanien reageer met ninhidrien om 'n blou- pers kleurkompleks te lewer, terwyl 'n mengsel van ninhidrien en isatien hierdie aminosuur grys kleur (Bremer *et al.*, 1981). Verskeie ensieme soos fenielalanienhidroksilase, -transaminase en -dekarboksilase kan fenielalanien as substraat benut (Scriver *et al.*, 1989).

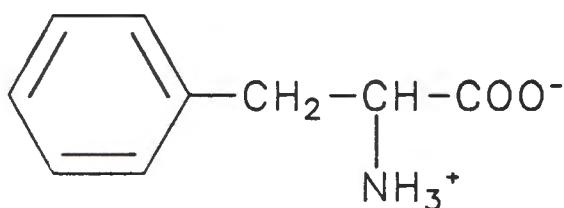


Fig. 2.1 Die "zwitterioniese" struktuur van fenielalanien. Hierdie voorstelling toon die struktuur van die aminosuur by pH 5.48.

'n Konstante interne milieu, wat as homeostase bekend staan, is belangrik vir die handhawing van lewe. Hiperfenielalanienemie is 'n fenotipe herkenbaar deur 'n fenielalanienwaarde, wat hoër as die normale waarde is. Die normale waarde verteenwoordig 'n ewewigstoestand en die afwykende waarde is 'n nuwe ewewigstoestand (Scriver *et al.*, 1989). Afhangende van die aard van die nuwe ewewigstoestand, kan dit gevolge vir 'n individu se gesondheid inhou. Fenielalanien kom in liggaamsvloeistowwe soos plasma en serebrospinale vog voor en word ook in klein hoeveelhede in die uriene uitgeskei. Die verskil in die normale plasma

feniellalanienkonsentrasies van jong individue en volwassenes is nie beduidend nie. Bremer *et al.* (1981) gee die normale plasmakonsentrasie van feniellalanien by babas as 0.023 - 0.069 mM aan. 'n Plasmafeniellalanienwaarde van 0.058 ± 0.015 mM by volwasse individue word as normaal bestempel (Scriver *et al.*, 1989).

2.3 NORMALE METABOLISME VAN FENIELALANIEN

Die feniellalanienhidroksilasereaksie is die enkele, belangrikste determinant van feniellalanienhomeostase in die menslike liggaam. Hierdie reaksie is 'n verpligte en snelheidsbepalende stap in die kataboliese weg van feniellalanien wat tot die volledige oksidasie van feniellalanien na koolstofdioksied en water lei (Milstien & Kaufman, 1975). Hidroksilering van feniellalanien speel 'n verdere belangrike rol in soogdiermetabolisme : dit voorsien die organisme van tirosien, 'n nie-essensiële aminosuur (Scriver *et al.*, 1989). Die hepatiese feniellalanienhidroksilasiesisteem is kompleks en behalwe vir die feniellalanienhidroksilase-ensiem (PAH), benodig dit tetrahydrobiopterien (BH_4) as kofaktor en die dihydropteridienreduktase-ensiem (DHPR), wat vir die regenerering van die kofaktor verantwoordelik is (Dhondt & Farriaux, 1987; Blau & Curtius, 1989).

Feniellalanienhidroksilase kataliseer 'n gekoppelde reaksie waarin feniellalanien na tirosien omgeskakel word en tetrahydrobiopterien tergelykertyd na kinonoïed-dihydrobiopterien (qBH_2) geoksideer word (Kaufman *et al.*, 1975; Scriver *et al.*, 1989). Hierdie hidroksilasereaksie, wat in Figuur 2.2 getoon word, verbruik feniellalanien en suurstof in die teenwoordigheid van BH_4 om tirosien en water te vorm (Scriver & Clow, 1980; Kaufman *et al.*, 1978). Onder hierdie omstandighede kan tetrahydrobiopterien slegs stoichiometries funksioneer : dit wil sê dat die hoeveelheid tirosien wat gevorm word nooit die hoeveelheid BH_4 teenwoordig kan oorskry nie (Scriver *et al.*, 1989; Scriver & Clow, 1980). Tetrahydrobiopterien tree as elektronskenker in die sisteem op en word tydens die reaksie na kinonoïed-dihydrobiopterien geoksideer (Güttler, 1980). Die dihidrovorm van die kofaktor is biologies onaktief en moet ensiematies na die aktiewe tetrahidrovorm gereduseer

word. Dihidropteridienreduktase kataliseer hierdie regenerering van die kofaktor op NADH-afhanklike wyse.

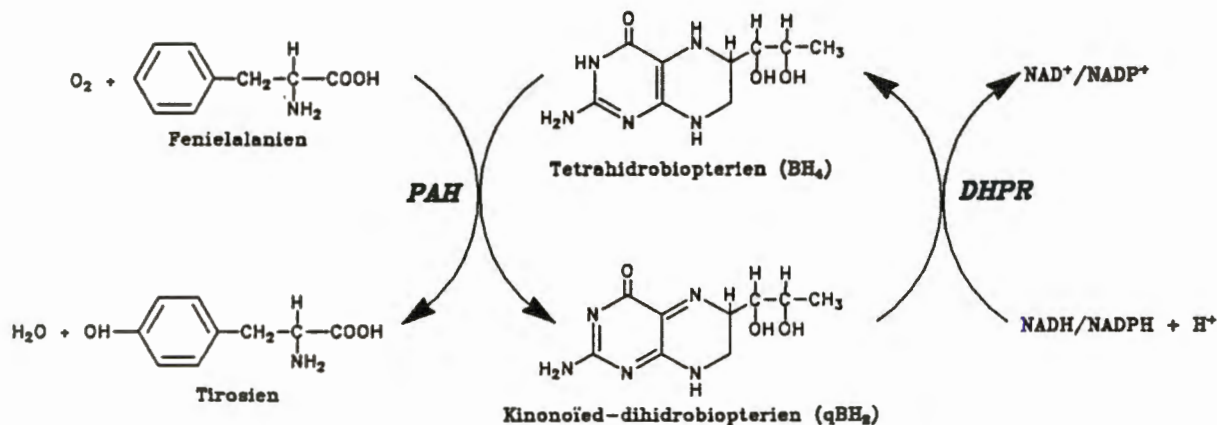


Fig. 2.2 Die fenielalanienhidroksilasereaksie. Fenielalanienhidroksilase (PAH) kataliseer die omskakeling van fenielalanien na tirosien in die teenwoordigheid van tetrahydrobiopterien (BH₄). Die biologies onaktiewe kofaktor (qBH₂) word op NADH-afhanklike wyse deur die dihidropteridienreduktase-ensiem (DHPR) na aktiewe BH₄ geregenereer (Ontleen aan Scriver *et al.*, 1989).

Alhoewel die fenielalanienhidroksilasereaksie die belangrikste stap in die katabolisme van fenielalanien is, is daar ook twee ander ensieme wat fenielalanien as substraat kan benut. Die verskillende metabolisme weë vanaf fenielalanien word in Figuur 2.3 getoon. Onder omstandighede waar die fenielalanienhidroksilasesisteem normaalweg funksioneer, maak transaminering en dekarboksilering 'n onbeduidende deel van die metabolisme van fenielalanien uit (Scriver *et al.*, 1989). Indien die fenielalanienvlakke egter as gevolg van 'n PAH-defek sou styg, word die fenielalanien deur alternatiewe geringe weë gemetaboliseer en verskeie ongewone, maar nie abnormale, metaboliete word in die uriene uitgeskei (Rampini *et al.*, 1974).

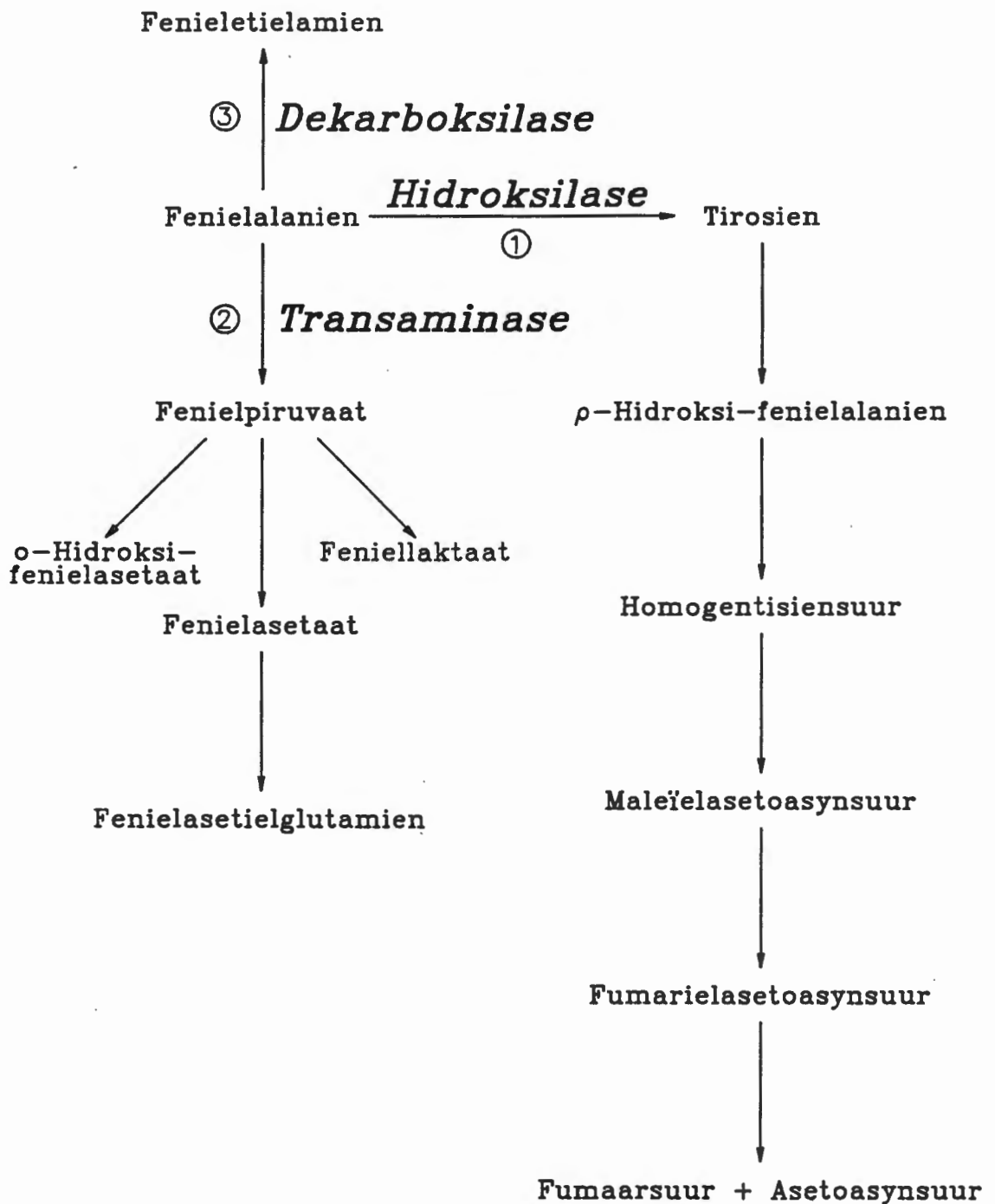


Fig. 2.3

Verskillende metaboliese weë vanaf fenielalanien. Normaalweg word fenielalanien na tirosien gehidroksileer (1). Indien hierdie weg geblokkeer is, word die aminosuur hoofsaaklik deur transaminering (2) na fenielpiruvaat omvorm. Dekarboksilering (3) van fenielalanien na fenieletielamien is ook moontlik, maar dié weg is nie by die mens van belang nie (Saamgestel uit Scriver *et al.*, 1989 en Goldsmith & Laberge, 1989).

Transaminering van feniellalanien word baie belangrik wanneer die hoof kataboliese weg geblokkeer of oorlaai is en lei tot die ontstaan van fenoliese komponente soos onder meer fenielpiruvaat, feniellaktaat, fenielasetaat en o-hidroksiefenielasetaat (Bremer *et al.*, 1981; Scriver *et al.*, 1989). In teenstelling met die transaminase-weg, vervul die **dekarboksilering** van feniellalanien na fenietielamien, selfs onder toestande waar die feniellalanienvlakke baie verhoog is, nie 'n belangrike rol in die mens nie (Scriver *et al.*, 1989).

2.4 TETRAHIDROBIOPTERIEN

2.4.1 BH₄ - homeostase

Die hipotese dat hiperfeniellalanienemie nie noodwendig die gevolg van 'n defekte PAH-ensiem is nie, is bevestig nadat 'n atipiese PKU-pasiënt in 1974 opgespoor is (Scriver *et al.*, 1989). Hierdie pasiënt, wat as "Bartholomé se moeilike pasiënt" bekend staan, is deur progressiewe neurologiese agteruitgang ten spyte van beperkte feniellalanien-inname gekenmerk (Blau, 1988; Dhondt, 1991). Vandag is dit bekend dat die ernstige neurologiese probleme by hierdie pasiënt aan defekte sintese van senuwee-oordragstowwe toegeskryf kan word.

Behalwe vir sy rol in die hidroksilering van feniellalanien, is tetrahydrobiopterien ook die natuurlike kofaktor van tirosienhidroksilase en triptofaanhidroksilase (Blau, 1988; Hoganson *et al.*, 1984; Kaufman *et al.*, 1983). Hidroksilering van laasgenoemde twee aromatiese aminosure is 'n vereiste vir die sintese van die senuwee-oordragstowwe, dopamien en serotonien (Blau & Curtius, 1989; Scriver *et al.*, 1989) en gevolglik is die beskikbaarheid van BH₄ essensieel vir die normale funksie van die sentrale senuweestelsel. Hierdie ewewigtoestand van tetrahydrobiopterien, oftewel **BH₄-homeostase**, is op sy beurt afhanklik van biosintese vanaf voorgangers, asook ensiematiese regenerering.

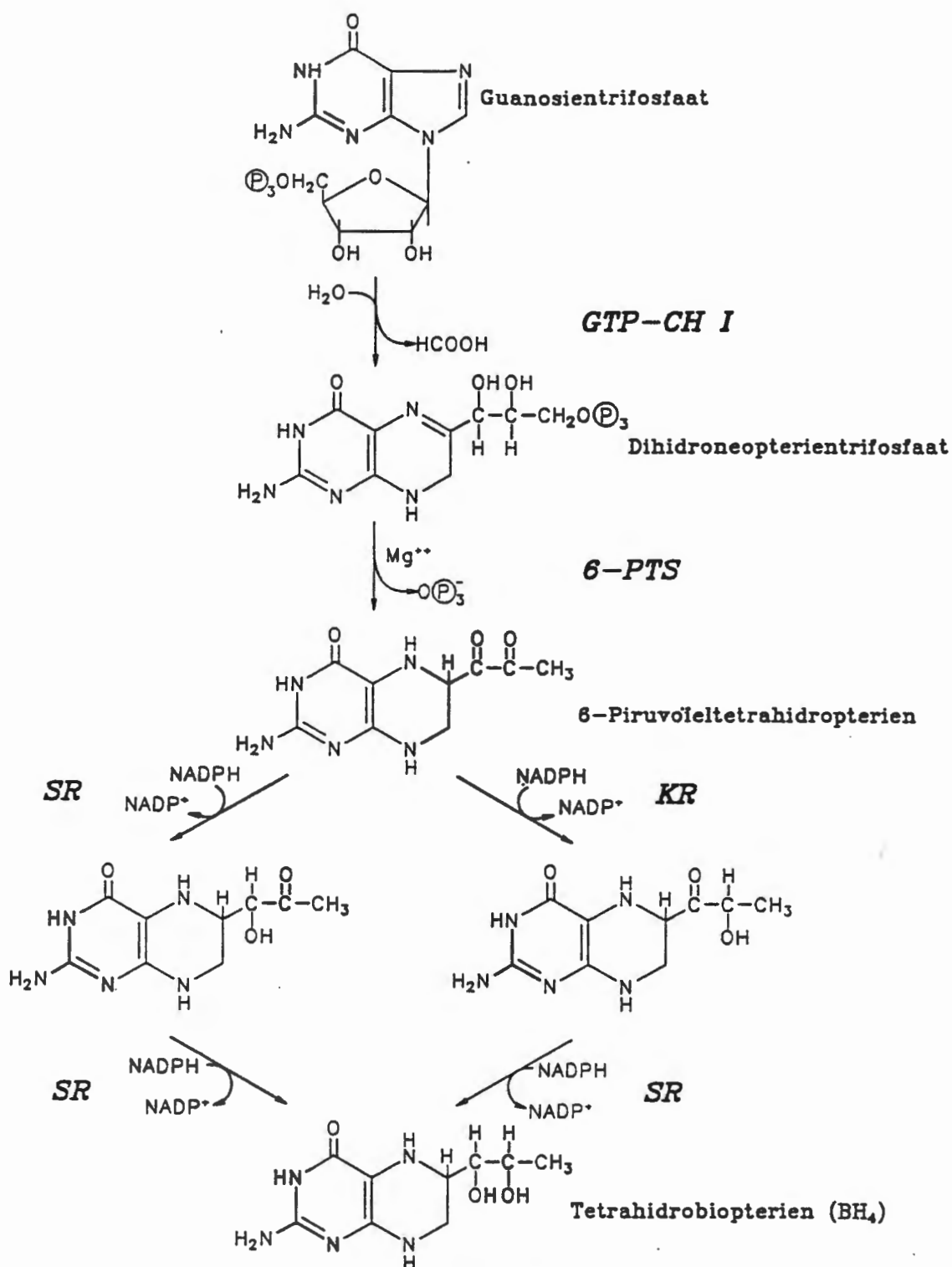


Fig. 2.4

Voorgestelde biosinteseveg van tetrahydrobiopterien vanaf GTP, soos dit in die mens plaasvind (Ontleen aan Blau, 1988).

Ⓟ = fosfaat; GTP-CH I = guanosintrifosfaat-siklohidrolase I; KR = 2'-keto-reduktase; SR = sepiapterienreduktase; 6-PTS = 6-piruvöeltetrahidropteriensintetase.

2.4.2 Biosintese van tetrahydrobiopterien

Die pteridien beslaan 'n groot groep struktureel variante natuurlike komponente wat by die biosintese van vitamien en kofaktore betrokke is. Pteridienderivate met 'n 2-amino-4-okso-6,7,8-trigraat staan as pteriene bekend, terwyl lumasiene 'n 2,4-dioksostruktuur bevat. Twee groepe word by die pteriene onderskei, naamlik gekonjugeerde en ongekonnekteerde pteriene (Blau, 1988).

Tetrahydrobiopterien is 'n ongekonnekteerde pterien, wat ensiematies vanaf guanosintrifosfaat in 'n groot verskeidenheid organismes gesintetiseer word (Scriver *et al.*, 1989). 'n Skematiese uiteensetting van hierdie komplekse biosintese-weg word in Figuur 2.4 getoon. Die eerste stap behels die omskakeling van GTP na 7,8-dihidroneopterientrifosfaat deur **GTP-siklohidrolase I**, met die gepaardgaande vrystelling van mieresuur (Blau & Curtius, 1989; Scriver *et al.*, 1989). Hierdie is die snelheidsbepalende stap by die meeste soogdiere, maar nie by die mens nie (Blau, 1988).

By mense is die tweede reaksie in die biosintese van BH_4 waarskynlik snelheidsbepalend. Die ensiem, **6-piruvoïeltetrahydropterien-sintetase (6-PTS)** kataliseer die reaksie, waartydens dihidroneopterientrifosfaat na 6-piruvoïeltetrahydropterien omgeskakel word (Niederwieser *et al.*, 1987). Hierdie omskakeling is magnesiumafhanklik en behels die eliminerings van trifosfaat, asook intramolekulêre herrangskikking (Blau & Curtius, 1989). Weens die onstabiele aard van 6-piruvoïeltetrahydropterien was die struktuur daarvan tot onlangs nog onbekend, maar met die hulp van 1H -KMR en FAB-MS is bevestig dat dit van die tetrahydro-vorm is.

Twee ensieme, **sepiapterienreduktase (SR)** en **2'-keto-reduktase (KR)**, kataliseer die tweestapreduksie van 6-piruvoïeltetrahydropterien na biologies aktiewe tetrahydrobiopterien. Soos in die skematiese voorstelling aangedui, is daar twee moontlike roetes vanaf 6-piruvoïeltetrahydropterien na BH_4 : die linkerkantse weg behels die vorming van 1'-hidroksie-2'-keto-tetrahydropterien, terwyl die regterkantse

weg via 1'-keto-2'-hidroksie-tetrahidropterien geskied. Dit is egter nog nie bewys dat beide reduktase-ensieme by die *in vivo* biosintese van BH_4 betrokke is nie (Scriver *et al.*, 1989).

2.4.3 Regenerering van die kofaktor

Soos reeds voorheen verduidelik, pendel die pterienkofaktor tussen die aktiewe BH_4 - en die onaktiewe qBH_2 -vorme tydens die hidroksileringsreaksie. Slegs die tetrahidrovorm is biologies aktief en die ensiem dihidropteridienreduktase is verantwoordelik vir die instandhouding van die kofaktor in sy ten volle gereduseerde toestand. Hierdie ensiem, wat wyd verspreid in menslike weefsel voorkom, kataliseer die reduksie van kinonoïed-dihidrobipterien na tetrahidrobipterien deur van 'n gereduseerde pirimidiennukleotied as elektronskenker gebruik te maak (Lockyer *et al.*, 1987). Alhoewel DHPR met beide NADH en NADPH aktief is, is NADH 'n beter substraat *in vitro*. Nie-ensiematiese omskakeling van qBH_2 na BH_4 kan in die teenwoordigheid van millimolêrhoeveelhede reduseringsreagense soos askorbaat of merkaptane plaasvind. Askorbaatbemiddelde regenerasie van BH_4 kon egter nog nie in die mens aangetoon word nie (Scriver *et al.*, 1989).

'n Ander ensiem, dihidrofolaatreduktase (DHFR), speel moontlik 'n indirekte rol tydens hidroksilering van fenielalanien *in vivo*. Aangesien die geoksideerde kofaktor (qBH_2) baie onstabiel is, ondergaan dit gereedelik tautomerisasie na die meer stabiele 7,8-dihidrobipterien. Die DHFR-ensiem kan 7,8-dihidrobipterien as substraat benut en dit na BH_4 omskakel (Scriver *et al.*, 1989; Scriver & Clow, 1980). Hierdie omskakeling is egter nie voldoende om BH_4 -vlakke in stand te hou nie. Verskeie sintetiese tetrahidropteriene met eenvoudige alkielsubstituentte soos 6-metieltetrahidropterien (6-MPH₄) en 6,7-dimetieltetrahidropterien (DMPH₄) is ook aktief in die fenielalanienhidroksilasesisteem (Hoganson *et al.*, 1984; Kaufman *et al.*, 1982).

2.4.4 Pteriene en die immuunrespons

Daar is 'n interessante korrelasie tussen pterienmetabolisme en die sellulêre respons teenoor infeksies. Schoedon en medewerkers (soos gedokumenteer in Scriver *et al.*, 1989) het bevind dat *in vitro* aktivering van die immuunrespons, met menslike γ -interferon, 'n styging in guanosientrifosfaat en guanosientrifosfaat-siklohidrolase I-aktiwiteit tot gevolg het. Aangesien GTP-CH I by die biosintese van BH_4 betrokke is, sal verhoogde aktiwiteit van hierdie ensiem 'n styging in die konsentrasie van dihidroneopterientrifosfaat veroorsaak (kyk Figuur 2.4). Neopterien is 'n degradasieproduk van dihidroneopterientrifosfaat en gevolglik gaan menslike sellulêre immuunrespons met verhoogde vorming van neopterien gepaard. Blau en Curtius (1989) wys daarop dat pasiënte wat infeksies onderlede het, verhoogde hoeveelhede neopterien in die uriene uitskei en dat die resultate van diagnostiese toetse daardeur beïnvloed kan word.

2.5 DEFEKTE VAN DIE FENIELALANIENMETABOLISME

Soos beskryf in Afdeling 2.3, is die fenielalanienhidroksilasesisteem baie kompleks en defekte in enige van die komponente in die sisteem kan tot die oormatige akkumulاسie van fenielalanien in liggaamsvloeistowwe lei (Dhondt & Farriaux, 1987). Defekte in die PAH-sisteem is die oorsaak van 'n verskeidenheid siektetoestande wat as die hiperfenielalanienemie bekend staan. Hiperfenielalanienemie (HPA) is 'n heterogene fenotipe wat as 'n plasma fenielalanienkonsentrasie hoër as 0.12 mM gedefinieer word (Bremer *et al.*, 1981; Scriver *et al.*, 1989). Twee fenotipes word onderskei :

- i) Fenielketonurie (PKU) ontstaan weens defekte fenielalanienhidroksilase en lei tot die akkumulاسie van fenielalanien in die bloed tot vlakke hoër as 1.2 mM.
- ii) Nie-PKU hiperfenielalanienemie of atipiese PKU ontstaan weens tetrahydrobiopteriengebrek en word deur plasmafenielalanienvlakke, wat laer as dié van PKU is, gekenmerk.

Siektetoestande, wat met 'n defek in die feniellalanienhidroksilasesisteem geassosieer word, is outosomaal resessief en die kliniese fenotipe ontstaan slegs as beide allele mutant is én die pasiënt aan feniellalanien blootgestel word (Scriver & Clow, 1980).

Kliniese variasies in pasiënte met aangebore metaboliese defekte is die gevolg van kwantitatiewe en kwalitatiewe verskille in die onderliggende mutasies, asook addisionele faktore. Hierdie stelling van Ponzone en medewerkers (1988) is veral van toepassing op die hiperfeniellalanienemieë, waar verskillende defekte in die PAH-sisteem tot 'n verskeidenheid kliniese toestande kan lei. Tabel 2.1 gee 'n opsomming van die belangrikste kliniese simptome en behandelingswyses van die verskillende hiperfeniellalanienemieë.

Die oorsaak van **feniellketonurie** (PKU) is die afwesigheid of onaktiwiteit van die feniellalanienhidroksilase-ensiem. Die belangrikste kliniese eienskap wat by onbehandelde PKU-pasiënte voorkom, is verstandelike gestremdheid (Okano *et al.*, 1990; Scriver *et al.*, 1989). Ander kliniese simptome van pasiënte met feniellketonurie sluit in : voedingsprobleme, aanvalle op vroeë ouderdom, afname in die pigmentering van die vel, hare en oë, ekseem, aggressiewe gedrag, hiperaktiwiteit, afname in groei, asook vertraagde psigometriese ontwikkeling (Bremer *et al.*, 1981; Tourian & Sidbury, 1983).

Blywende hiperfeniellalanienemie word deur 'n verlaging in die feniellalanienhidroksilase-aktiwiteit of 'n verminderde hoeveelheid van hierdie ensiem veroorsaak. In die algemeen is pasiënte klinies normaal, maar ernstige gevalle kan verstandelike vertraging tot gevolg hê (Tourian & Sidbury, 1983).

Oorganklike hiperfeniellalanienemie is die gevolg van vertraagde uitdrukking van feniellalanienhidroksilase, soos meestal by vroeggebore babas aangtrek word. Die plasmavlakke van feniellalanien is aanvanklik dieselfde as by PKU, maar normaliseer later. Pasiënte met hierdie tipe HPA is klinies normaal en 'n lae feniellalaniëndieet kan toegepas word totdat die biochemiese parameters normaliseer (Tourian & Sidbury, 1983; Möhr, 1989).

Tabel 2.1

Klassifikasie van die hiperfenielalanienemieë*

Toestand	Ou benaming	Ensiemdefek	Kliniese simptome	Behandeling
Fenielketonurie (PKU)	Tipe I	PAH afwesig of defek	Ernstige verstandelike gestremdheid. Gedragsafwykings	Lae fenielalaniendieet
Blywende HPA	Tipe II	Verlaagde PAH-aktiwiteit of hoeveelheid	Mild. Ernstiger gevalle kan verstandelik vertraag wees	Geen of tydelike dieetbehandeling
Oorganklike HPA	Tipe III	Vertraagde uitdrukking van PAH	Minder ernstig	Lae fenielalaniendieet totdat phe-vlakke normaliseer
BH ₄ -dishomeostase	Tipe IV	DHPR	Aanvanklik mild. Progressiewe neurologiese agteruitgang. Vertraagde groei. Verskeie postuurprobleme	Lae fenielalaniendieet, foliensuur, karbidopa, voorgangers van senuwee-oordragstowwe
BH ₄ -gebrek	Tipe V	GTP-CH I of 6-PTS	Dieselfde as BH ₄ -dishomeostase	Dieselfde as bogenoemde asook BH ₄
Maternale PKU	Tipe X	Transport van phe oor die plasenta	Verstandelike vertraagdheid	Lae fenielalaniendieet tydens swangerskap

* Saamgestel uit Bremer *et al.* (1981), Blau (1988) en Möhr (1989).

Kofaktordefekte kan ook verskillende tipes hiperfenielalanienemieë tot gevolg hê. Defekte in drie verskillende ensieme, naamlik GTP-CH I, 6-PTS en DHPR kan aanleiding tot kofaktordefekte gee (Blau, 1988). Hierdie defekte kan tot probleme met die *de novo* sintese of regenerering van tetrahydrobiopterien lei (Dhondt, 1984).

BH₄-dihomeostase word deur 'n defek in die regenerering van die kofaktor veroorsaak (Scriver *et al.*, 1989). Die dihidropteridienreduktase-ensiem (DHPR) is defek by hierdie siektetoestand (Dhondt, 1984; Blau 1988). Pasiënte met DHPR-defek toon progressiewe neurologiese agteruitgang (Dhondt *et al.*, 1984). 'n Variante vorm van DHPR-defek, wat as "**nie-responsiewe**" **DHPR-defek** bekend staan, is in 'n enkele geval aangetoon (Endres *et al.*, 1987). Hierdie skaars vorm van DHPR-defek word daaraan uitgeken dat pasiënte glad nie op 'n dosis van 20 mg BH₄/kg liggaamsmassa reageer nie. Daar is gevind dat nie-responsiewe DHPR-defekte pasiënte mutante DHPR-proteïen in hul selle het, maar dat geen mutante proteïen in die selle van DHPR-defekte pasiënte, wat wel op die toediening van BH₄ reageer, voorkom nie (Cotton *et al.*, 1986; Ponzzone *et al.*, 1988).

BH₄-gebrek is die gevolg van defekte in die sinteseweg van tetrahydrobiopterien. Afwesigheid of mutante guanosintrifosfaat-siklohidrolase I of 6-piruvoïeltetrahydropteriensintetase lei tot tetrahydrobiopteriengebrek (Blau, 1988).

Beide siektetoestande wat met BH₄-defek geassosieer word, word deur progressiewe neurologiese agteruitgang en ander kliniese simptome, soos voedingsprobleme, kwyling weens slukprobleme, swak postuur en kopbeweging, hipotoniese bolyf, hipertoniese ledemate, hipertermie sonder infeksie, konvulsies en vertraagde groei, gekenmerk (Blau, 1988; Niederwieser *et al.*, 1984a).

Maternale PKU kom voor by kinders van onbehandelde moeders met PKU. Die kinders is verstandelik gestrem en toon ander kliniese simptome van PKU, alhoewel hulle nie geneties PKU het nie (Tourian & Sidbury, 1983). Indien die konsentrasie van fenielalanien in die moeder 'n kritiese hoë vlak van ongeveer 1.1 mM oorskry, vind transport van fenielalanien deur die plasenta plaas. Hierdie oormaat

fenielalanien het 'n nadelige uitwerking op die fetus. Die normale groei van die fetus word versteur, met gevolglike vertraagde groei, mikrokefalie en verstandelike gestremdheid (Scriver *et al.*, 1989).

Primapterienurie is 'n nuwe variante vorm van atipiese fenielketonurie, wat onlangs in 'n kind met milde hiperfenielalanienemie aangetoon is (Blau *et al.*, 1989b). Hierdie siektetoestand word deur die urinêre uitskeiding van 'n nuwe metaboliet, primapterien (7-iso-biopterien) gekenmerk. Twee ander metaboliete, 6-okso-primapterien en anapterien, is in laer konsentrasies in die uriene aangetref. Die oorsprong van hierdie metaboliete is egter nog onbekend.

Hiperfenielalanienemie is een van die mees algemene resessiewe genetiese siektetoestande by Kaukasiërs, met 'n insidensie van sowat 1 uit 10 000 lewende geboortes (Scriver *et al.*, 1989). Gevalle van fenielketonurie maak die grootste deel hiervan uit, terwyl die variante vorms minder algemeen voorkom. Daar is groot geografiese en etniese variasie in die voorkoms van PKU en uit die beskikbare data blyk dit dat verskillende populasies verskillende PKU-alleles dra (Scriver *et al.*, 1989; Levy, 1989b).

Alhoewel die presiese insidensie van hiperfenielalanienemie as gevolg van kofaktordefekte nie bekend is nie, word dit algemeen op 1 - 3 % van HPA-gevalle geskat (Dhondt *et al.*, 1988; McInnes *et al.*, 1984). In 'n omvattende register van tetrahydrobiopteriendefekte, noem Dhondt (1991) dat altesaam 201 pasiënte met kofaktordefekte oor die wêreld nagespoor is. Die insidensie van die verskillende defekte, soos uiteengesit deur Dhondt (1991), word in Tabel 2.2 gelys.

Tabel 2.2 Uiteensetting van die voorkoms van die verskillende BH₄-defekte^a

Defek	Aantal gevalle			% Insidensie ^b
	Manlik	Vroulik	Geslag onbekend	
6-PTS-defek	50	44	10	57.1 %
GTP-CH I-defek	4	1	1	3.3 %
DHPR-defek	29	31	6	36.3
Primapterienurie	4	1	1	3.3 %
Totaal	87	77	18	
% Insidensie ^b	47.8 %	42.3 %	9.9 %	

^a Saamgestel uit Dhondt (1991).

^b % Insidensie uit 'n groep bevestigde HPA-pasiënte

Defekte van BH₄-biosintese maak sowat 60 % van die gevalle uit, terwyl defekte wat lei tot BH₄-dishomeostase ongeveer 36 % bedra. Soos aangedui in Tabel 2.2, is die voorkoms van hierdie siektetoestande ongeveer gelykop tussen manlike en vroulike pasiënte verdeel.

2.6 DIFFERENSIËLE DIAGNOSE

2.6.1 Die grondslag

Uit Afdeling 2.5 en Tabel 2.1 is dit duidelik dat hiperfenielalanienemie die gevolg van 'n verskeidenheid defekte kan wees. Aangesien hierdie defekte verskillende aspekte van die fenielalanienemetabolisme affekteer, verskil die kliniese manifestasies van die verskillende siektetoestande. Die prognose en behandeling van die hiperfenielalanienemievariante verskil van mekaar en verskeie outeurs wys op die belang van vroeë differensiële diagnose vir doelmatige hantering van individuele

gevalle (Brewster *et al.*, 1979; Milstien *et al.*, 1980; Matsubara *et al.*, 1984; Dhondt *et al.*, 1988).

'n Goeie begrip van die werking van die fenielalanienhidroksilasesisteem staan sentraal tot die suksesvolle interpretasie van biochemiese variasies wat met die verskillende hiperfenielalanienemieë geassosieer word. Figuur 2.5 toon skematies aan hoe die verskillende komponente van hierdie komplekse sisteem aan mekaar skakel. Hierdie figuur dien ook as grondslag om die effek van 'n spesifieke ensiemdefek op ander komponente van die sisteem te voorspel en te fasiliteer met die keuse van analitiese tegnieke. Differensiële diagnose van hierdie groep siektetoestande kan op verskillende vlakke uitgevoer word. **Metaboliëtanalises** gee 'n aanduiding van die status van metaboliëte wat normaalweg asook onder patologiese toestande in die sisteem voorkom. Met **ensiëmanalises** kan die aktiwiteit van die verskillende ensieme betrokke by die sisteem direk nagegaan word, terwyl **DNA-analises** die aard van die onderliggende mutasie op geen-vlak kan blootlê. Differensiële diagnose deur van verskillende kombinasies van metaboliëtoetse, meting van ensiemaktiwiteit en DNA-analises gebruik te maak, kan ook vir prenatale diagnose aangewend word (Scriver *et al.*, 1989).

2.6.2 Diagnose van klassieke PKU

Fenielketonurie word as 'n **plasmafenielalanienkonsentrasie** hoër as 1.2 mM gedefinieer (Scriver *et al.*, 1989) en gevolglik kan absolute aminosuorkonsentrasies, wat met behulp van outomatiese aminosuuranalise verkry word, as eerste kriterium vir diagnose aangewend word. Tweedens kan teenwoordigheid van **fenoliese komponente**, soos fenielpiruvaat, fenielasetaat en fenielaktaat in pasiënte se uriene daarop dui dat die PAH-sisteem oorlaai is en dat fenielalanien langs alternatiewe weë weggevoer word (Bremer *et al.*, 1981; Scriver *et al.*, 1989). PKU-pasiënte beskik nie oor die vermoë om fenielalanien na tirosien om te skakel nie en gevolglik sal 'n **fenielalanienbeladingstoets** hoë plasmafenielalanienvlakke oor 'n tydperk handhaaf en geen of slegs geringe styging in tirosienkonsentrasie tot gevolg hê.

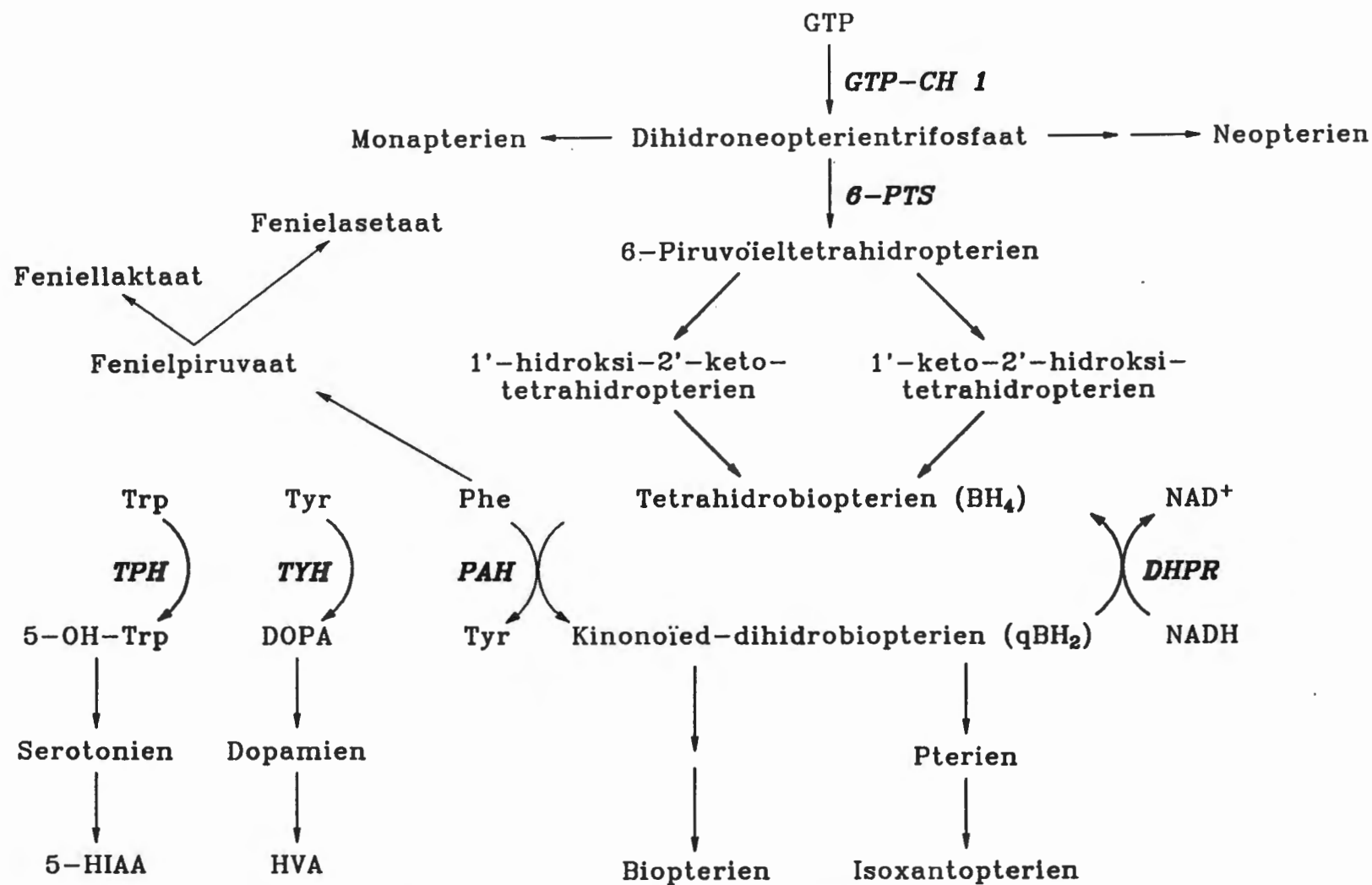


Fig. 2.5 Skematiese voorstelling van die verskillende komponente betrokke by die PAH-sisteem (Saamgestel uit Blau, 1988 en Scriver *et al.*, 1989). Die afkortings word in Bylaag B vermeld.

Die **feniellalanienhidroksilase-aktiwiteit** kan *in vitro* of *in vivo* nagegaan word, maar hierdie prosedures vereis onderskeidelik 'n lewerbiopsie en isotoop gemerkte substrate tesame met spesiale deteksiemetodes (Scriver *et al.*, 1989).

Op die gebied van DNA-analises is daar twee tegnieke wat aangewend kan word vir die diagnosering van PKU :

- i) **RFLP-haplotipes** wat met 'n spesifieke PKU-mutasie geassosieer word, is informatief maar kan nie in isolasie gebruik word nie. Hierdie metode is ook arbeidsintensief en gevolglik kan dit nie vir die toetsing van groot populasies aangewend word nie (DiLella *et al.*, 1988; Möhr, 1989).
- ii) Die **polimerase kettingreaksie (PCR)** bespoedig sifting vir mutante allele by die PAH-lokus. Hierdie metode berus op die eksponensiële versterking van DNA-volgordes *in vitro* deur van DNA-polimerase en oligonukleotiedvoorvoeders aan weerskante van die gebied waar die mutasie voorkom, gebruik te maak. Hibridisering van mutasie spesifieke oligonukleotiedpeilers aan hierdie geamplifiseerde DNA deur van "dot-blots" en "slot-blots" gebruik te maak, kan PKU-pasiënte, PKU-draers en onaangetaste individue van mekaar onderskei (DiLella *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1990). Hierdie metode is by uitstek geskik vir sifting van groot populasies, aangesien klein hoeveelhede monsters (DNA) benodig word en die prosedure relatief vinnig en goedkoop is. Ten spyte hiervan het hierdie tegniek ook sekere beperkings. Die aard van die mutasie moet bekend wees, sodat geskikte voorvoeders en peilers gesintetiseer kan word. Verder bestaan daar 'n groot hoeveelheid verskillende mutasies en dit is onmoontlik om elke pasiënt vir almal te toets.

2.6.3 Diagnose van BH_4 -defekte

2.6.3.1 Feniellalanien

Alhoewel die plasmafeniellalanienvlakke van die BH_4 -defekte variante nie binne vaste

grense val nie, het dit tog eiesoortige waardes. Hierdie groep siektetoestande word deur plasma fenielalanienvlakke laer as dié van PKU (1.2 mM) gekenmerk (Scriver *et al.*, 1989).

2.6.3.2 Pterienmetaboliete

Analise van urinêre pteriene is die metode van keuse vir sifting en differensiële diagnose van BH₄-defekte. Die urinêre uitskeidingspatroon van pteriene is kenmerkend vir elk van die siektetoestande wat met defekte in BH₄-biosintese en -regenerering geassosieer word (Blau, 1988; Niederwieser *et al.*, 1985). Daar bestaan ook metodes om tussen die geoksideerde en gereduseerde toestande van BH₄ te onderskei (Milstien *et al.*, 1980; Fukushima & Nixon, 1980). Die verhouding waarin neopterien en biopterien tot mekaar staan, asook die oksidasietoestand van die kofaktor word vir differensiële diagnose van die verskillende BH₄-defekte aangewend. By normale individue is meer as 50 % van die biopterien in die volle gereduseerde tetrahidrovorm. Verder kom neopterien (N) en biopterien (B) ongeveer in gelyke hoeveelhede voor, sodat die N/B - verhouding min of meer gelyk is aan 1 (Scriver *et al.*, 1989).

By pasiënte met 'n defek in GTP-CH I, die eerste ensiem in die biosintese van BH₄, is beide neopterien- en biopterienwaardes drasties verlaag, maar die verhouding waarin dié twee pteriene tot mekaar staan is normaal. Verder word pasiënte met hierdie vorm van hiperfenielalanienemie deur lae vlakke totale biopterien gekenmerk (Niederwieser *et al.*, 1985).

Die pterienuitskeidingspatroon van 6-PTS-defekte pasiënte toon nie alleen baie lae of nie-waarneembare biopterienvlakke nie, maar ook aansienlik verhoogde neopterienvlakke. Gevolglik is die N/B - verhouding baie hoog, maar totale biopterienvlakke laag in vergelyking met normaalwaardes (Dhondt, 1991). Daar kan tussen tipiese 6-PTS-defekte pasiënte en pasiënte met perifêre 6-PTS-defek onderskei word. Pasiënte met perifêre 6-PTS-defek se urinêre pterienpatroon is soortgelyk aan

dié van tipiese pasiënte, maar die pterienpatroon in serebrospinale vloeistof is normaal (Scriver *et al.*, 1989).

Aangesien DHPR-defekte pasiënte oor intakte kofaktorbiosintese beskik, word BH_4 normaalweg gesintetiseer. Hierdie BH_4 word egter dadelik tot qBH_2 omvorm en dit resulteer in 'n effektiwe en voortdurende BH_4 -tekort. Weens hierdie tekort aan BH_4 vind daar nie terugvoerinhibisie van GTP-CH I plaas nie en gevolglik bly die pterienbiosintese geaktiveer (Dhondt, 1991). Liggaamsvloeistowwe van DHPR-defekte pasiënte bevat derhalwe groot hoeveelhede totale biopterien. Die N/B - verhouding by hierdie pasiënte is gewoonlik laag, maar gevalle waar dit normaal was, is al waargeneem (Scriver *et al.*, 1989). By hierdie pasiënte is die vlakke van aktiewe tetrahydrobiopterien drasties verlaag en die meerderheid biopterien is in die geoksiede toestand. Dhondt (1991) noem dat daar slaggate met die metabolietanalises bestaan en dat veral DHPR-defekte pasiënte gemis kan word as dit in isolasie gebruik word.

2.6.3.3 Tetrahydrobiopterienbeladingstoets

Danks en medewerkers (soos gedokumenteer in Blau, 1988) het bevind dat plasmafenielalanienvlakke van HPA-pasiënte 'n afname toon na binne-aarse toediening van BH_4 . Die BH_4 -beladingstoets het sedertdien 'n belangrike diagnostiese metode geword, wat algemeen vir die differensiële diagnose van tetrahydrobiopterien-defekte gebruik word. Gevalle waar hiperfenielalanienemie die gevolg van defekte BH_4 -biosintese is, behoort 'n duidelike afname in plasmafenielalanienvlakke na die toediening van BH_4 te toon (Dhondt *et al.*, 1988). Hierdie toets is egter nie betroubaar vir toetsing van defekte in die regenerering van die kofaktor nie. Sommige DHPR-defekte pasiënte reageer goed op 'n BH_4 -beladingstoets, terwyl ander slegs gedeeltelik daarop reageer (Blau, 1988; Cotton *et al.*, 1986). Verder is daar ook gevalle wat glad nie op die toediening van BH_4 reageer nie (Cotton *et al.*, 1986; Endres *et al.*, 1987). Ponzone en medewerkers (1987) het 'n dosis van 20 mg BH_4 /kg liggaamsmassa voorgestel, met die veronderstelling dat hierdie dosis ook

pasiënte met DHPD-defek sou uitwys. 'n Geval van 'n pasiënt wat egter nie op hierdie hoë dosis gereageer het nie, is in die literatuur gedokumenteer (Endres *et al.*, 1987). Die outeurs verwys daarna as "nie-responsiewe" DHPD-defek.

2.6.3.4 Metaboliete van senuwee-oordragstowwe

Soos reeds genoem in Afdeling 2.4.1 is BH_4 ook die natuurlike kofaktor van tirosien- en triptofaanhidroksilase. 'n Onvermoë tot hidroksilering van tirosien en triptofaan resulteer in verlaagde vorming van serotonien en die katecholamien. Gevolglik sal hiperfenielalaninemie as gevolg van 'n kofaktordefek tot lae dopamien- en serotonienvlakke in die brein lei en ernstige neurologiese abnormaliteite tot gevolg hê (Blau, 1988). Vlakke van homovanilliensuur en 5-hidroksie-indoolasynsuur, wat afbraakprodukte van onderskeidelik dopamien en serotonien is, reflekteer die sintese van senuwee-oordragstowwe in die sentrale senuweestelsel (Lou *et al.*, 1985).

In die geval van PKU is die vlakke van hierdie metaboliete in plasma, uriene en serebrospinale vloeistof matig verlaag, maar drastiese verlaging kom by gevalle van defekte BH_4 -biosintese en -regenerering voor (Scriver *et al.*, 1989). Analise van afbraakprodukte van dopamien en serotonien in serebrospinale vloeistof is veral van belang om tussen tipiese 6-PTS-defek en perifêre 6-PTS-defek te onderskei. Laasgenoemde toestand word aan normale vlakke van hierdie metaboliete in serebrospinale vog gekenmerk (Niederwieser *et al.*, 1987; Blau & Curtius, 1989; Dhondt, 1991).

2.6.3.5 Toetsing van ensiemaktiwiteit

Aangesien metabolietanalises nie altyd die eksakte aard van 'n BH_4 -defek kan vaspen nie, is ensiemanalises noodsaaklik om die diagnose te verifieer (Dhondt 1991; Blau & Curtius, 1989; Niederwieser *et al.*, 1986). Meting van ensiemaktiwiteit as mees diskriminerende parameter vir differensiële diagnose van BH_4 -defekte, dui die presiese

punt van die metaboliese blok aan (Blau, 1988). Metodes wat die ensiemaktiwiteit van GTP-CH I, 6-PTS en DHPR in 'n verskeidenheid monstertipes bepaal, is in die literatuur gedokumenteer (Scriver *et al.*, 1989; Blau, 1988).

Die ensiemaktiwiteit van GTP-CH I kan in lewerbiopsiemonsters of gestimuleerde mononukleonêre leukosiete gemeet word (Niederwieser *et al.*, 1984a; Blau *et al.*, 1985). GTP-CH I-aktiwiteit in ongestimuleerde mononukleonêre bloedselle is byna nie-waarneembaar en kan verkeerdelik vir die aangebore defek aangesien word. Om dié rede benadruk Blau en medewerkers (1985) dat die prosedure vir voorbereiding van selle noukeurig nagevolg moet word. Lae aktiwiteit van die 6-PTS-ensiem is in eritrosiete en lewerselle van pasiënte met beide tipiese en perifêre 6-PTS-defek aangetoon (Scriver *et al.*, 1989; Niederwieser *et al.*, 1986). Deur die ensiemaktiwiteit van 6-PTS in eritrosiete na te gaan, kan daar tussen pasiënte en heterosigotiese draers onderskei word (Shintaku *et al.*, 1988). Die DHPR-ensiem word in 'n wye verskeidenheid menslike weefsel uitgedruk en meting van DHPR-aktiwiteit is reeds in lewerselle, fibroblaste, leukosiete, eritrosiete, amniosiete, asook chorioniese villi uitgevoer (Blau, 1988; Scriver *et al.*, 1989). Arai en medewerkers (1982) het 'n metode ontwikkel om DHPR-aktiwiteit in gedroogde bloeddruppels op Guthrie-kaarte te meet. Hierdie metode word algemeen en op roetine wyse vir die diagnose van DHPR-defek gebruik.

2.6.4 Prenatale diagnose

Die belang van vroeë differensiële diagnose is reeds in Afdeling 2.6 aangespreek. Weens die ernstige aard van hierdie siektetoestande is prenatale diagnose belangrik vir genetiese voorligting aan risikofamilies (Blau, 1988; Scriver *et al.*, 1989). Haplotipe-analise kan vir die prenatale diagnose van PAH-defek aangewend word. Daar is ook 'n geval in die literatuur gedokumenteer waar meting van hepatiese PAH-aktiwiteit op 'n fetus wat 19 weke oud was gedoen is (Scriver *et al.*, 1989). Prenatale diagnose van BH₄-defekte is deur die meting van pterienmetaboliëte in amnionvog moontlik gemaak. Bepaling van ensiemaktiwiteit in gekweekte

amnionselle, fetale lewerbiopsie, chorioniese villi-biopsie, asook fetale bloed word in die literatuur genoem (Blau, 1988).

Aangesien GTP-CH I nie in chorioniese villi, amniosiete óf fetale eritrosiete voorkom nie, is die prenatale diagnose van hierdie defek hoofsaaklik tot die analise van pterienmetaboliëte in amnionvog beperk (Dhondt, 1991). Dieselfde benadering kan gevolg word om 6-PTS-defek by die fetus uit te wys, maar die pterien-fenotipe kan egter nie tussen homosigote en heterosigote onderskei nie (Scriver *et al.*, 1989). Niederwieser en medewerkers (1986) was suksesvol om lae 6-PTS-aktiwiteit in eritrosiete van 'n geaffekteerde fetus aan te toon. Die wydverspreide voorkoms van DHPR-aktiwiteit maak prenatale diagnose van DHPR-defek in amniosiete, fetale eritrosiete, asook chorioniese villi moontlik (Scriver *et al.*, 1989).

Die vinnige ontwikkeling van die rekombinante DNA-tegnologie behoort sensitiewer en meer selektiewe tegnieke vir die prenatale diagnose van BH₄-defekte in die toekoms daar te stel (Blau, 1988). In Afdeling 2.6 is twee moontlike tegnieke kortliks bespreek. Dit is belangrik om die beperkings van hierdie ontwikkelende tegnologie, veral ten opsigte van nuwe mutasies, nie uit die oog te verloor nie.

2.7 SAMEVATTING

Soos reeds in Hoofstuk 1 genoem, vorm die geval van 'n swart HPA-pasiënt die kern van hierdie verhandeling. Die doel van hierdie hoofstuk was om die nodige literatuur met betrekking tot sekere aspekte van die hiperfenielalanienemieë, wat nodig is om Hoofstuk 5 te verstaan, uiteen te sit. Daar is gepoog om verskillende biochemiese aspekte wat met 'n defek in die hidroksilering van fenielalanien geassosieer word, aan te spreek. Die klem het op die kompleksiteit van die fenielalanienhidroksilasesisteem en differensiële diagnose van die verskillende hiperfenielalanienemieë geval. 'n Skematiese samevatting van die wyse waarop die verskillende komponente van die fenielalanienhidroksilasesisteem aan mekaar skakel word in Figuur 2.5 getoon.

HOOFSTUK 3

VOORKOMS VAN DEFEKTE VAN DIE AMINOSUURMETABOLISME IN 'N GROEP NEONATALE EN PEDIATRIESE PASIËNTE

3.1 INLEIDING

Sekere defekte van die aminosuurmetabolisme in die mens het 'n belangrike rol gespeel in die opklaring van die weë waarlangs aminosure in gesonde individue gemetaboliseer word. Alhoewel defekte van die aminosuurmetabolisme skaars is, is die mortaliteit daarvan hoog. Baie van hierdie siektetoestande lei ook tot verstandelike vertraging. Vroeë diagnose en geskikte behandeling in die gevalle waar dit moontlik is, is baie belangrik vir die voorkoming van neurologiese skade en sterftes by pasiënte met afwykings van die aminosuurmetabolisme (Caruso *et al.*, 1989). Met die koms van gespesialiseerde apparaat en beter siftingsmetodes word pasiënte meer geredelik vir defekte van die aminosuurmetabolisme gediagnoseer. Bremer *et al.* (1981) het daarop gewys dat die toepassing van 'n enkele tegniek gewoonlik nie voldoende is om 'n behoorlike diagnose te maak nie. Vir hierdie studie is daar van eendimensionele dunlaagchromatografie, sowel as kwantitatiewe analise met behulp van 'n outomatiese aminosuuranaliseerder gebruik gemaak.

Plasma- en urienmonsters van verskeie neonatale en pediatriese pasiënte is na die metabolisme laboratorium van die departement Biochemie aan die PU vir CHO verwys. Die pasiënte was hoofsaaklik uit die Pretoria- en Witwatersrandgebied afkomstig. Sekere kliniese simptome wat op moontlike aangebore metaboliese siektetoestande kon dui, is deur dokters en pediater as kriteria gebruik om die gespesialiseerde analyses aan te vra. Ongewone kliniese simptome soos stuipe, voedingsprobleme, aanhoudende braking, hipertonie, hipotonie, asidose, vertraagde verstandelike en motoriese ontwikkeling, asook 'n familiegeskiedenis van aangebore

metaboliese siektetoestande het as verwysingskriteria gedien ('n volledige lys verskyn in Tabel 3.6). Die plasma- en urienmonsters is aan eendimensionele dunlaagchromatografie onderwerp om 'n kwalitatiewe aanduiding van die aminosuurninhoud te kry. Monsters wat abnormaliteite op die dunlaag getoon het, is daarna met 'n outomatiese aminosuuranaliseerder verder ondersoek. 'n Kort uiteensetting van die protokol wat gevolg is, word in Figuur 3.1 weergegee. Data wat op bogenoemde wyse verkry is, is gebruik om defekte van die aminosuurmetsbolisme te diagnoseer.

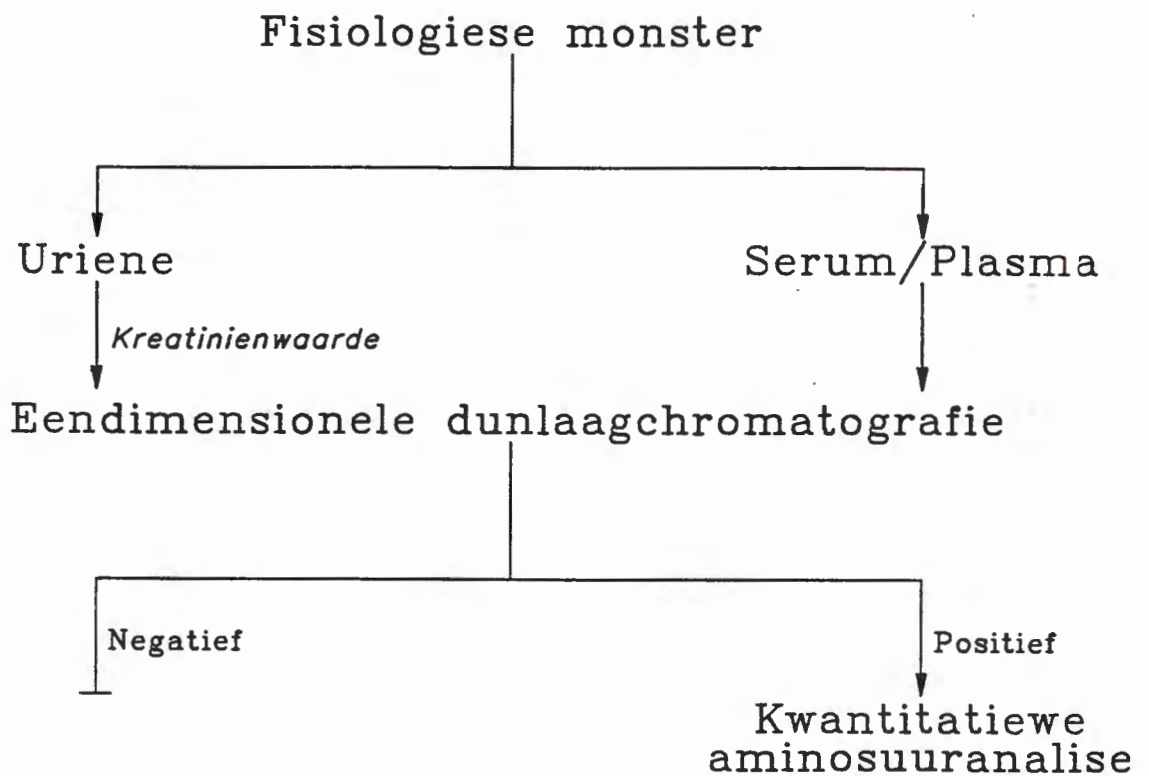


Fig. 3.1 Vloedidiagram van die siftingsprotokol wat vir die opsporing van defekte van die aminosuurmetsbolisme gevolg is. Die gedetailleerde prosedures word in Afdeling 3.2 uiteengesit.

3.2 SIFTINGSPROSEDURES

3.2.1 Eendimensionele dunlaagchromatografie

'n Gewysigde weergawe van die metode van Bremer *et al.* (1981) is toegepas. Eerstens is die kreatinienwaarde met behulp van die spektrofotometriese metode van Vasiliades (1976) bepaal om 'n aanduiding van die gekonsentreerdheid van die urienmonster te verkry. Die reaksiemengsel van 5.06 ml het 3 ml water, 1 ml van 'n 0.75 M natriumhidroksiedoplossing¹ en 0.06 ml uriene bevat. Vir 'n standaard is die uriene met 0.06 ml van 'n 100 mg% (m/v) kreatinienoplossing vervang en vir 'n blanko is die uriene met dieselfde hoeveelheid water vervang. By elk van die reaksiemengsels is 1 ml van 'n 0.02 M pikriensuuroplossing gevoeg. Na 20 minute by kamertemperatuur is die optiese digtheid van die reaksiemengsels teenoor die blanko by 520 nm met 'n Milton-Roy 20D spektrofotometer bepaal. Die kreatinieninhoud is bereken deur gebruik te maak van die formule:

$$\text{Kreatinienkonsentrasie (mg\%)} = [K_{r_u}/K_{r_s}] \times 100$$

waar: K_{r_u} = optiese digtheid van urienmonster by 520 nm en

K_{r_s} = optiese digtheid van die standaard by 520 nm.

Op grond van die kreatinieninhoud van die individuele urienmonsters is die volume uriene wat per dunlaagskeiding aangewend moes word met behulp van die kromme in Figuur 3.2 bepaal. Hierdie volume uriene is met 'n mikrosput in 'n dun bandjie van ongeveer 15 mm lank op 100 × 200 mm sellulosedunlaagplate (Merck 5577), 10 mm vanaf die onderkant van die dunlaag aangewend. Vir die analise van serum- of plasammonsters is 'n konstante hoeveelheid van 4 μ l serum of plasma op dieselfde wyse as die uriene op die dunlae aangebring. 'n Aminosuurstandaard wat twaalf aminosure in hul boonste normale konsentrasies bevat (Tabel 3.1) is ook op die dunlaag aangebring. 'n Mengsel van aseton, n-butanol, water en asynsuur is in 'n

¹ 'n Materiaallys verskyn in Bylaag A.

verhouding van 35 : 35 : 20 : 10 as loopmiddel gebruik.

Tabel 3.1 Samestelling van die aminosuurstandaardmengsel wat vir dunlaagchromatografie aangewend is

Aminosuur	Konsentrasie ^a		Normaalwaardes ^b (mM)
	mg % (m/v)	mM	
Alanien	50	0.56	0.099 - 0.300
Fenielalanien	30	0.18	0.023 - 0.069
Glisien	30	0.40	0.056 - 0.300
Glutamien	100	0.68	0.057 - 0.470
Histidien	20	0.13	0.024 - 0.122
Leusien	60	0.46	0.045 - 0.155
Lisien	30	0.20	0.045 - 0.150
Prolien	50	0.40	0.051 - 0.185
Serien	20	0.20	0.024 - 0.170
Threonien	30	0.25	0.033 - 0.130
Tirosien	30	0.17	0.011 - 0.122
Valien	40	0.34	0.057 - 0.262

^a Die aminosure is in 10 % isopropanol, waarin 'n druppel HCl gevoeg is, opgelos. Hierdie oplossing is in 'n verhouding van 1 : 10 met water verdun waarna dit in kleiner volumes gevries is.

^b Konsentrasies aminosure in plasma of serum van babas en jong kinders soos deur Bremer *et al.* (1981) gepubliseer.

Die gelugdroogde dunlae is in die loopmiddel tot 5 mm vanaf die bokant gechromatografeer, waarna die plate weer gelugdroog en die chromatografiese proses in dieselfde dimensie herhaal is. Na die dubbelchromatografie in een dimensie is die dunlae gelugdroog en in 'n kleuringsreagens van 0.5 g % (m/v) ninhidrien in asetoon onderdompel. Dit is dadelik verwyder en vir 10 minute in 'n oond by 70°C verhit. Na kleuring is die dunlae by -20°C bewaar.

Urien-, serum-, of plasmamonsters van pasiënte wat vir aminosuuranalise verwys is, is deurgaans in die eerste fase van die siftingsprogram met behulp van

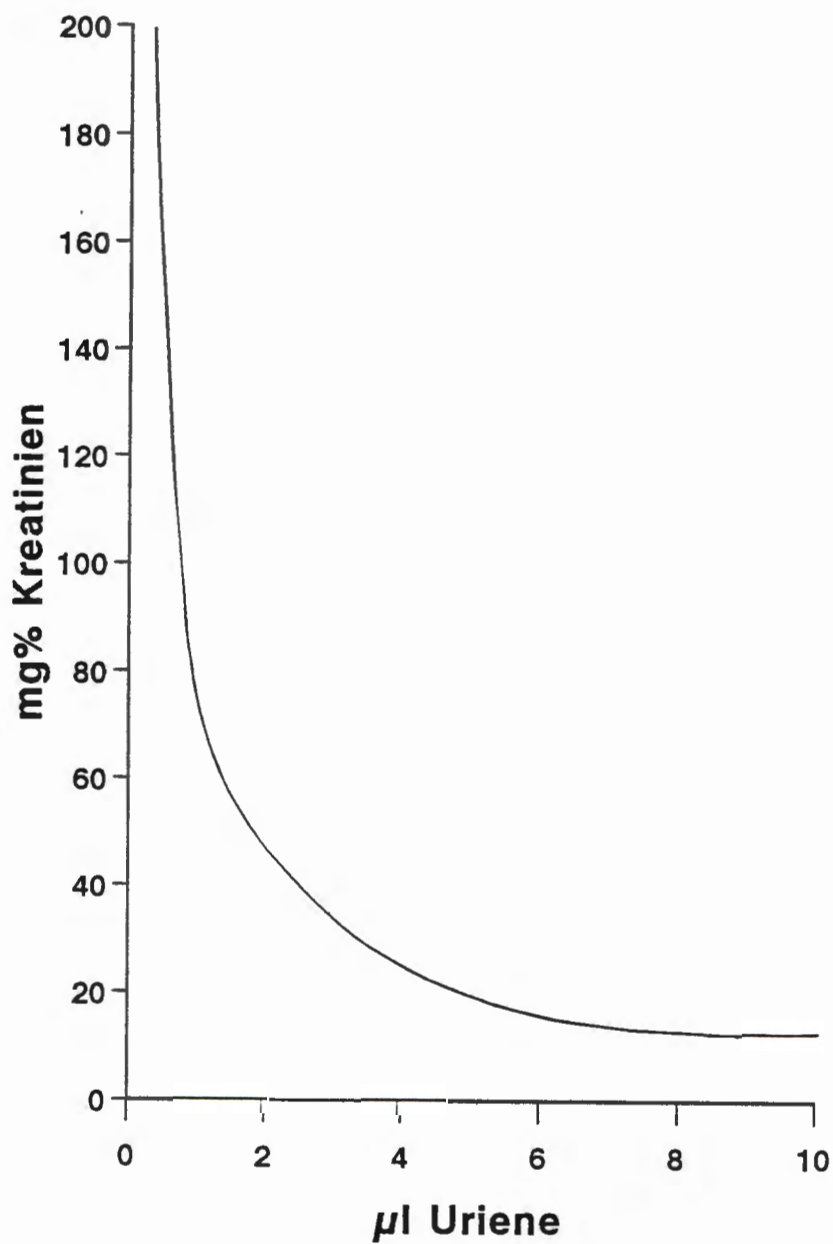


Fig. 3.2 Verband tussen die kreatinienwaarde van die monster in mg% (m/v), en die volume uriene in mikroliter wat per dunlaagskeiding aangewend is (L.J. Mienie, persoonlike kommunikasie²).

² Mnr L.J. Mienie. Departement Biochemie, Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, Potchefstroom.

dunlaagchromatografie geanaliseer. 'n Voorbeeld van sodanige analyses van ses urienmonsters word in Figuur 3.3 in vergelyking met die skeiding van 'n standaardmengsel van 12 aminosure getoon. Die twaalf aminosure is op grond van die volgende oorwegings gekies:

- i) Soos behoort te volg uit Figuur 3.3 (baan 4) en 'n diagrammatiese voorstelling van die chromatogram in Figuur 3.4 is die aminosure geredelik onderskeibaar en identifiseerbaar. In die geval van his en lys, asook gly en ser is die onderskeid egter nie so duidelik nie, aangesien die onderskeie pare aminosure baie dieselfde R_f - waardes vertoon (Figuur 3.4). Soos te verwagte is die prolienband na ninhidrienkleuring moeilik onderskeibaar.
- ii) Hierdie aminosure kom algemeen in fisiologiese vloeistowwe voor en hulle is verteenwoordigend van die aminosure wat gewoonlik onder patologiese toestande verhoog is. So byvoorbeeld is feniëlaanien en histidien onderskeidelik by die hiperfeniëlaanienemieë en histidienemie verhoog. Verhogings in glisienvlakke kan 'n aanduiding van organiese suurdefekte gee, terwyl verhoogde konsentrasies glutamien op defekte van die ureumsiklus kan dui (Bremer *et al.*, 1981).

Die skeidingspatroon van 'n gegewe monster is op kwalitatiewe wyse met die standaardmengsel vergelyk. Aangesien die konsentrasies van die standaardmengsel die boonste normaalwaardes in bloedmonsters reflekteer (kyk Tabel 3.1), mag 'n meer intense ninhidrien positiewe band in die chromatogram van 'n pasiëntmonster op 'n buitengewoon hoë voorkoms van die aminosuur dui. Alhoewel hierdie vergelyking nie kwantitatief uitgevoer is nie, bied so 'n vergelyking tog 'n mate van 'n kwasi-kwantitatiewe analise. Met 'n bietjie ondervinding kan daar tussen normale patrone, tipiese abnormales, asook artefakte onderskei word.

Voorbeelde van chromatogramme van pasiënte met afwykings in die katabolisme of transport van aminosure word in Figuur 3.5 getoon. Die skeidingspatroon van aminosure in hierdie pasiëntmonsters is opvallend verskillend van dié in Figuur 3.3, wat 'n tipiese chromatogram verteenwoordig. Deur elk van die pasiënt urienmonsters (Figuur 3.5, bane 1, 2 en 5 - 9) met die normale urienmonster (baan 3)

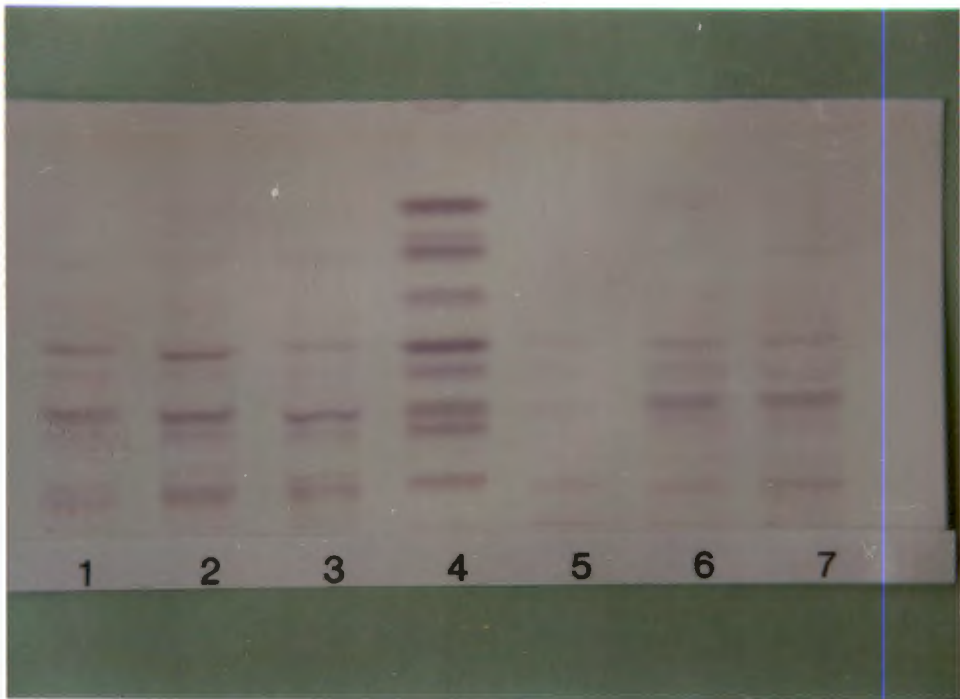


Fig. 3.3 Tipiese dunlaagskeiding van ninhidrien positiewe komponente in ses urienmonsters in vergelyking met die standaardmengsel van 12 aminosure. Chromatografie en kleuring is uitgevoer soos beskryf in die teks. Die urienmonsters is onderskeidelik in bane 1-3 en 5-7 aangebring. Baan 4 is die aminosuurstandaardmengsel.

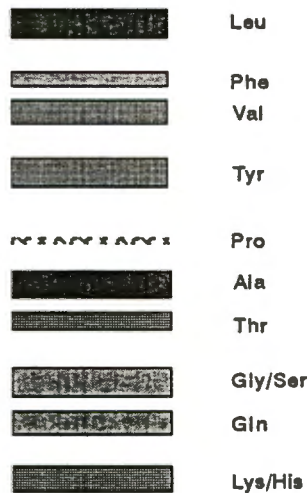


Fig. 3.4 Diagrammatiese voorstelling van die dunlaagskeidingspatroon van die aminosuurstandaardmengsel, wat in Figuur 3.3 baan 4 getoon is.

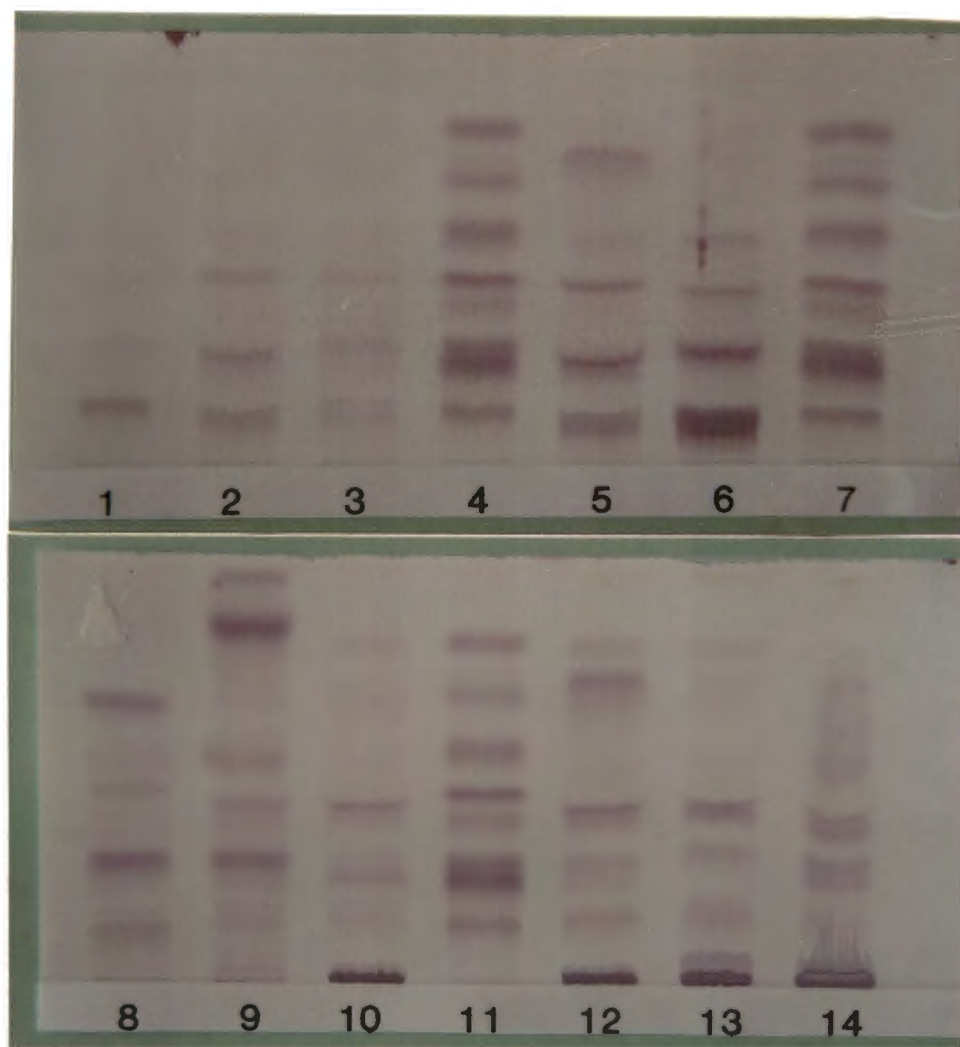


Fig. 3.5 Dunlaagchromatogramme van bevestigde pasiënte in vergelyking met die aminosuurstandaard, asook normale fisiologiese monsters.

Baan 1 : Urienmonster van 'n histidienemiepasiënt.

Baan 2 : Urienmonster van 'n persoon met hiperornitienemie.

Baan 3 : Normale urienmonster.

Baan 4 : Aminosuurstandaard.

Baan 5 : Urienmonster van 'n hiperfenielalanienemiepasiënt.

Baan 6 : Urienmonster van 'n persoon met hiperlisienemie.

Baan 7 : Urinêre uitskeiding van aminosure by 'n Hartnup-pasiënt.

Baan 8 : Urienmonster van 'n pasiënt met hipermetionienemie.

Baan 9 : Urienmonster van 'n persoon wat medikasie ontvang het.

Baan 10: Normale plasmamonster.

Baan 11: Aminosuurstandaard.

Baan 12: Plasmamonster van 'n HPA-pasiënt.

Baan 13: Plasmamonster van 'n hiperlisienemie-pasiënt.

Baan 14: Plasmamonster van 'n persoon met tirosienemie.

te vergelyk, is dit duidelik dat die monsters wat van pasiënte afkomstig is meer intense aminosuurbande toon of addisionele bande bevat. Die aminosuurinhoud van plasmamonsters afkomstig van pasiënte (bane 12 - 14) toon ook duidelike verskille in vergelyking met die normale plasmamonster (baan 10). Die donker bande by die aanwendingspunt van die plasmamonsters word veroorsaak deur plasmaproteïene wat nie vooraf verwyder is nie.

Dunlaagchromatografie is 'n eenvoudige tegniek en groot getalle fisiologiese monsters kan vir 'n verskeidenheid abnormaliteite in die aminosuurmetabolisme getoets word. Hierdie tegniek is veral geskik vir die sifting van groot populasies. Die tegniek is vinnig en betroubaar, terwyl minimale monstervoorbereiding nodig is. Die reagentse en apparaat wat benodig word, is ook relatief goedkoop. Alhoewel eendimensionele dunlaagchromatografie 'n kragtige tegniek is, het dit egter beperkings. Aangesien fisiologiese aminosure in groepe geskei word, is dit soms moeilik om tussen die verskillende aminosure te onderskei en gevolglik is daar 'n mate van onsekerheid. Dunlaagchromatografie is ook hoofsaaklik 'n kwalitatiewe tegniek. Vir meer akkurate diagnoses behoort kwantitatiewe data beskikbaar te wees. Desnieteenstaande is eendimensionele dunlaagchromatografie 'n goeie eerste benadering in die opsporing van defekte van die aminosuurmetabolisme, maar kan nie in isolasie gebruik word nie. Hierdie tegniek behoort slegs as 'n eerste benadering gebruik te word en in die geval van positiewe bevindinge behoort addisionele kwantitatiewe metodes vir die bevestiging van moontlike abnormaliteite aangewend te word.

3.2.2 Kwantitatiewe aminosuuranalise

Voordat die fisiologiese monsters aan kwantitatiewe aminosuuranalise onderwerp is, moes hulle sekere voorbereidingsstappe deurloop. Vir urienmonsters is die volume uriene wat vir 'n kwantitatiewe analise benodig is, met behulp van die volgende formule bereken (L.J. Mienie, persoonlike kommunikasie²):

$$\text{Volume uriene } (\mu\ell) = [20 / \text{kreatinienwaarde}] \times 1000$$

Dié volume uriene is met pH 2.2 litiumbuffer (Beckman, P/N 239447) tot 1000 μl verdun. Monsters waarvan die kreatinienwaarde 20 mg% of kleiner was is nie verdun nie, maar 1000 μl van daardie uriene is direk per analise gebruik. As interne standaard is 100 μl van 'n 2.5 mM nor-leusienoplossing in pH 2.2-litiumbuffer toegevoeg. Om die monsters te deproteïeneer is 100 μl van 'n 10 g% (m/v) sulfo-salisielsuuroplossing in water telkens byvermeng en die presipitate is by 11 000 opm vir 15 minute in 'n Eppendorf sentrifugeerder afgeswaai. Elke supernatant is afgetrek en deur 'n steriele 0.2 μm Microgon-filter gefiltreer alvorens dit deur middel van outomatiese aminosuuranalise gekwantifiseer is.

Vir serum - en plasmamonsters is 40 μl interne standaard en 100 μl van 'n 10 g% (m/v) sulfo-salisielsuuroplossing by 'n konstante volume van 400 μl serum of plasma gevoeg. Om die meeste proteïene te presipiteer, is monsters vir 60 minute by kamertemperatuur gelaat en die presipitate is daarna in 'n Eppendorf sentrifugeerder afgeswaai. Aangesien dié deproteïeneringstap nie volledig was nie en filtrasie van die supernatant deur 0.2 μm Microgon filters steeds onvoldoende was, is bykomende proteïenmateriaal met behulp van sentrifugale filtrasie deur Millipore Ultrafree-MC filters, waarvan die afsnypunt 10 000 molekulêre massa-eenhede is, verwyder. Die helder filtraat is verder geanaliseer.

Kwantitatiewe bepaling van aminosure in fisiologiese monsters is met behulp van 'n Beckman System Gold aminosuuranalisesisteen gedoen. Hierdie gespesialiseerde apparaat, wat skematies in Figuur 3.6 getoon word, maak van ioonuitruilingschromatografie gebruik om die aminosure van mekaar te skei. 'n Konstante monstervolume van 20 μl is per analise gebruik. Drie litiumsitraatbuffers waarvan die pH onderskeidelik 2.75, 3.6 en 4.0 was, is vir die analises gebruik. Die buffers is spesifiek vir hierdie aminosuuranalisesisteen en word deur die Beckman maatskappy verskaf. Die vloeitempo van die buffers deur die sisteem was konstant op 0.4 ml/minuut gestel. Buffer pH 2.75 is vir 8.5 minute deurgepomp, gevolg deur buffer pH 3.6 vir 26.5 minute, waarna vir 70 minute na buffer pH 4.0 oorgeskakel

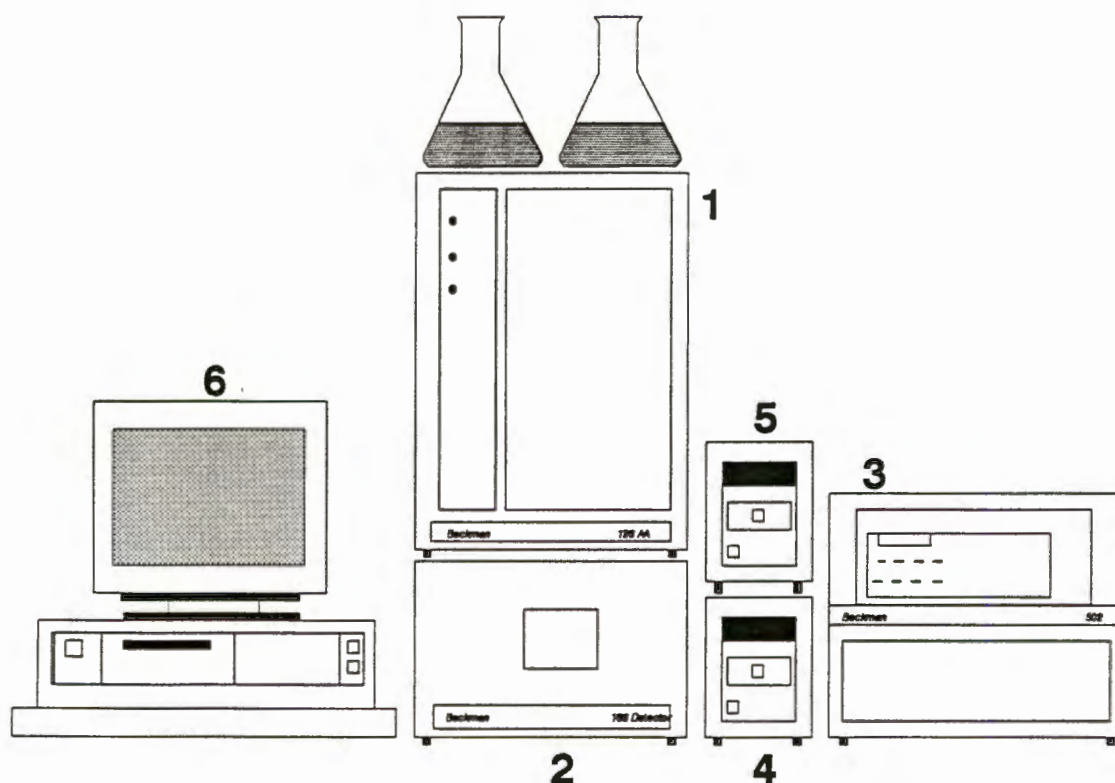


Fig. 3.6 Komponente van die Beckman System Gold aminosuuranalisesisteen.

- 1 = 126 AA-pompsisteen
- 2 = 166-programmeerbare detektor
- 3 = 502-outomatiese monsterinlaatsisteen
- 4 = 235-kolomverwarmer
- 5 = 231-post-kolomreaktor
- 6 = mikrorekenaar met System Gold chromatografiese sagteware.

is. Die kolomtemperatuur was aanvanklik 41°C en na 26 minute is dit na 67°C verhoog. Ninhidrienreagens het teen 'n konstante vloeitempo van 0.4 ml/minuut in 'n post-kolomreaksie met die eluaat van die kolom reageer. Hierdie reagens is as volg voorberei : 544 g natriumasetaat is in 500 ml water in 'n waterbad by 70°C opgelos. Nadat die natriumasetaat opgelos is, is 100 ml ysasynsuur bygevoeg en die volume is met water tot 1000 ml aangevul. Die pH is met asynsuur op 5.51 ingestel. Per geleentheid is 125 ml van hierdie natriumasetaatbuffer, 125 ml water en 750 ml etileenglikool- monometieleter saamgevoeg en stikstof vir vyf minute deurgeborrel. Daarna is 20 g ninhidrien by die oplossing gevoeg en goed geroer terwyl stikstof steeds deurgeborrel is. Nadat die ninhidrien opgelos het, is 0.4 g

tindichlorieddihidraat bygevoeg. Die resulterende rooi-bruin oplossing is as ninhidrienreagens vir die aminosuuranaliseerder gebruik. Ter wille van die ninhidrienreaksie is 'n konstante temperatuur van 120°C in die post-kolomreaktor gehandhaaf. Spektrofotometriese deteksie van die aminosuur-ninhidrien komplekse was by 570 nm. Na elke monster is die kolom met 'n litiumhidroksiedoplossing (Beckman P/N 239448) geregenereer. 'n Volledige analise, regenerering ingesluit, het ongeveer 2½ uur geduur.

Identifisering van die pieke op 'n aminosuurprofiel is aan die hand van 'n standaard aminosuurmengsel (Beckman 239435) gedoen. Berekening van die fisiologiese aminosuurskonsentrasies is met behulp van 'n mikrorekenaarprogram gedoen, waarna die waardes met normaalwaardes in die literatuur vergelyk is. Soos geïllustreer in Afdeling 3.4, kan verhoogde konsentrasie van 'n enkele aminosuur of 'n kombinasie van aminosure aan 'n moontlike defek van die aminosuurmetabolisme gekoppel word. Vergelyking van die profiel van die aminosuurstandaard (Figuur 3.7) met profiele van fisiologiese monsters (Figuur 3.8) toon duidelik dat fisiologiese monsters slegs sommige van die aminosure wat in die standaard aminosuurmengsel voorkom, bevat.

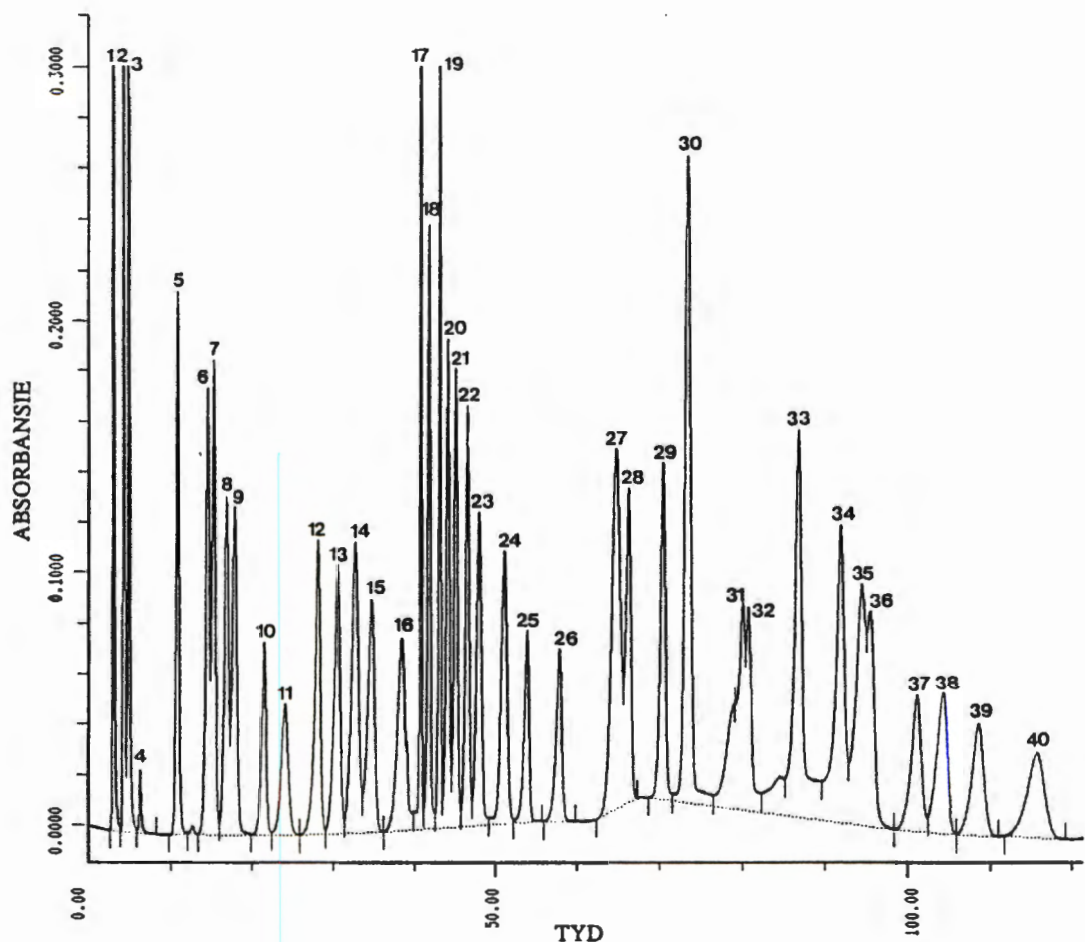


Fig. 3.7 Profiel van die aminosuurstandaard na chromatografiese skeiding op 'n Beckman System Gold aminosuuranaliseerder.

Piekidentifikasie

1. Fosfoserien	15. α -Aminobottersuur	29. Etanolamien
2. Taurien	16. Valien	30. Ammoniak
3. Fosfo-etanolamien	17. Sisteien	31. Hidroksi-lisien
4. Ureum	18. Metionien	32. Hidroksi-lisien
5. Aspartiensuur	19. Systationien	33. Ornitien
6. Threonien	20. Iso-leusien	34. Lisien
7. Serien	21. Leusien	35. 1-Metiel-histidien
8. Asparagien	22. Nor-leusien (IS)	36. Histidien
9. Glutamiensuur	23. Tirosien	37. 3-Metiel-histidien
10. Sarkosien	24. Feniellalanien	38. Anserien
11. α -Amino-adipiensuur	25. β -Alanien	39. Karnosien
12. Glisien	26. β -amino-iso-bottersuur	40. L- α -Amino- β - guanidinopropioonsuur
13. Alanien	27. Homosistien	
14. Sitrullien	28. γ -Aminobottersuur	

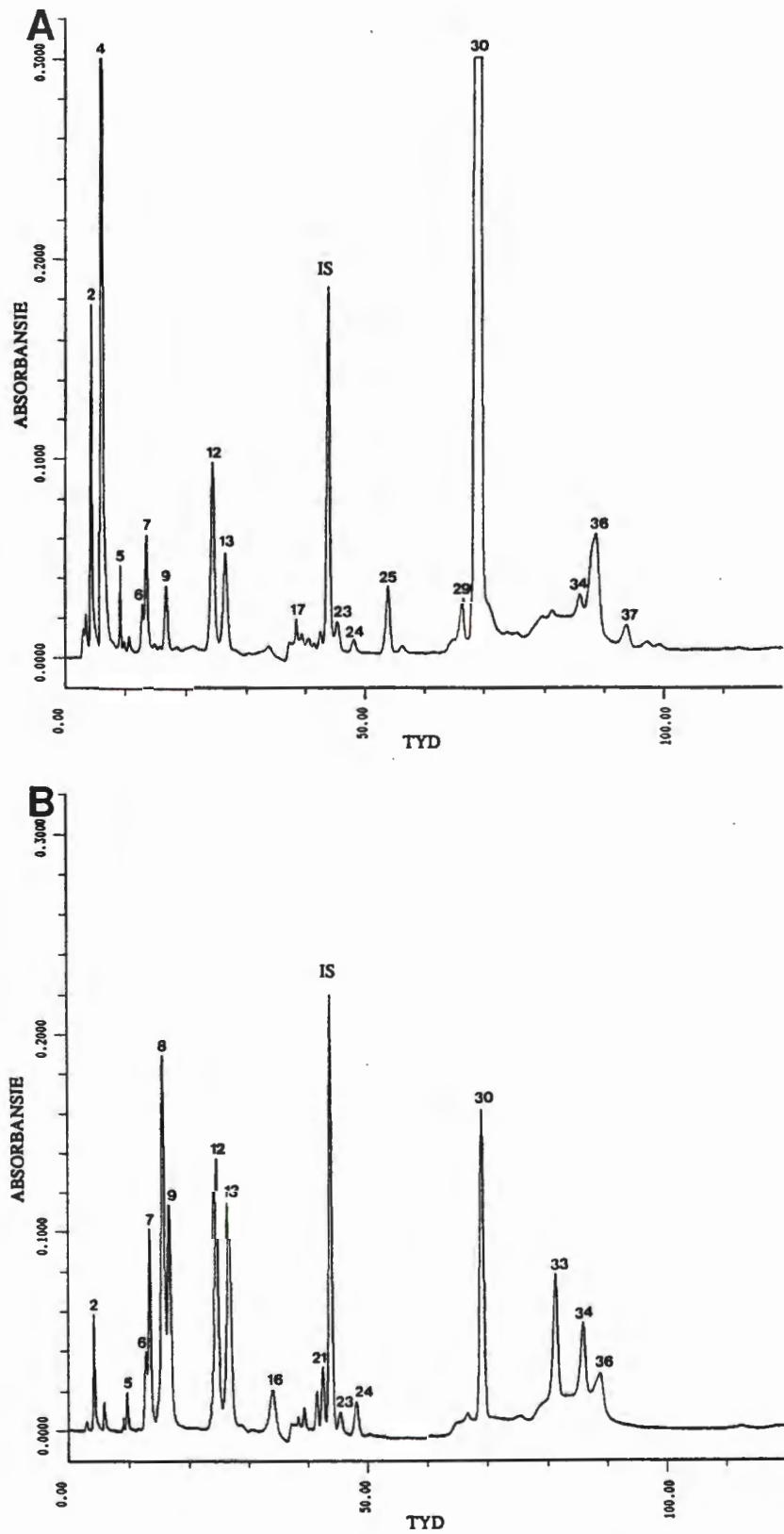


Fig. 3.8 Aminosuurprofielen van fysiologische monsters. Paneel A toont 'n normale urienmonster en Paneel B toont 'n normale plasmamontster. Identifisering van pieke is aan die hand van Figuur 3.7 gedoen.

3.3 RESULTATE VAN DIE SIFTINGSPROGRAM

Oor 'n tydperk van twee jaar is ongeveer 1700 monsters vir defekte van die aminosuurmetabolisme getoets. Die meerderheid van die monsters wat na die metabolismelaboratorium verwys is, is met eendimensionele dunlaagchromatografie geanaliseer, behalwe monsters wat reeds deur sommige privaat patoloë op grond van abnormale chromatogramme verwys is. In die tydperk 1 November 1989 tot 30 November 1990 is fisiologiese monsters afkomstig van 698 pasiënte met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie nagegaan. Daarenteen is fisiologiese monsters van slegs 432 pasiënte in die tydperk 1 Desember 1990 tot 31 Desember 1991 met dié tegniek getoets.

Daar is verskeie redes vir die groot verskil in die aantal pasiënte wat in die onderskeie periodes verwys is. Eerstens blyk dit dat die pasiënte in die tydperk 1 Desember 1990 tot 31 Desember 1991 beter geselekteer is as in die voorafgaande tydperk. Tweedens het sommige patoloë self die monsters met behulp van dunlaagchromatografie begin toets en slegs monsters met abnormaliteite vir kwantitatiewe analyses verwys. Verder is daar teruggesny op die monsters wat deur H.F. Verwoerd Hospitaal se neonatale afdeling verwys is, aangesien baie van die monsters van gesonde individue afkomstig was. Figuur 3.9 tref 'n vergelyking tussen die hoeveelheid en aard van die monsters wat oor die twee periodes aan eendimensionele dunlaagchromatografie onderwerp is. Ongeveer 23 % van die monsters wat oor die tydperk van twee jaar met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie geanaliseer is, het abnormaliteite getoon. Die aantal monsters wat op grond van dunlaagchromatografie as normaal of moontlik abnormaal tipeer is, word in Tabel 3.2 weergegee.

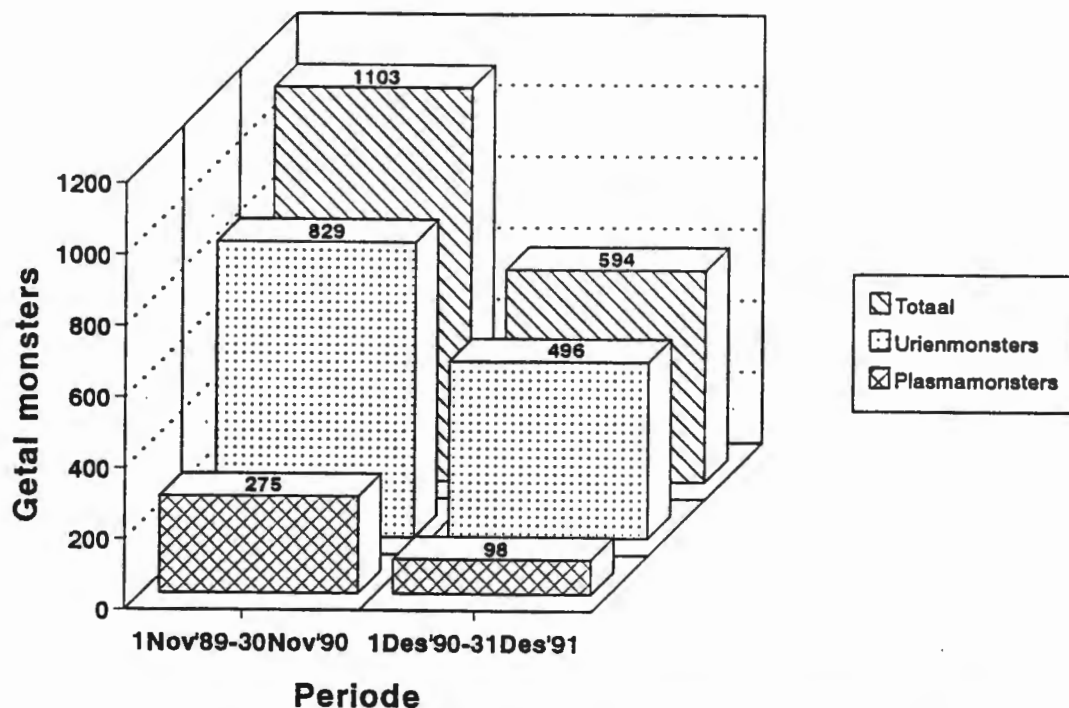


Fig. 3.9 Grafiese uiteensetting van die aard en hoeveelheid monsters wat oor die twee periodes met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie geanalyseer is.

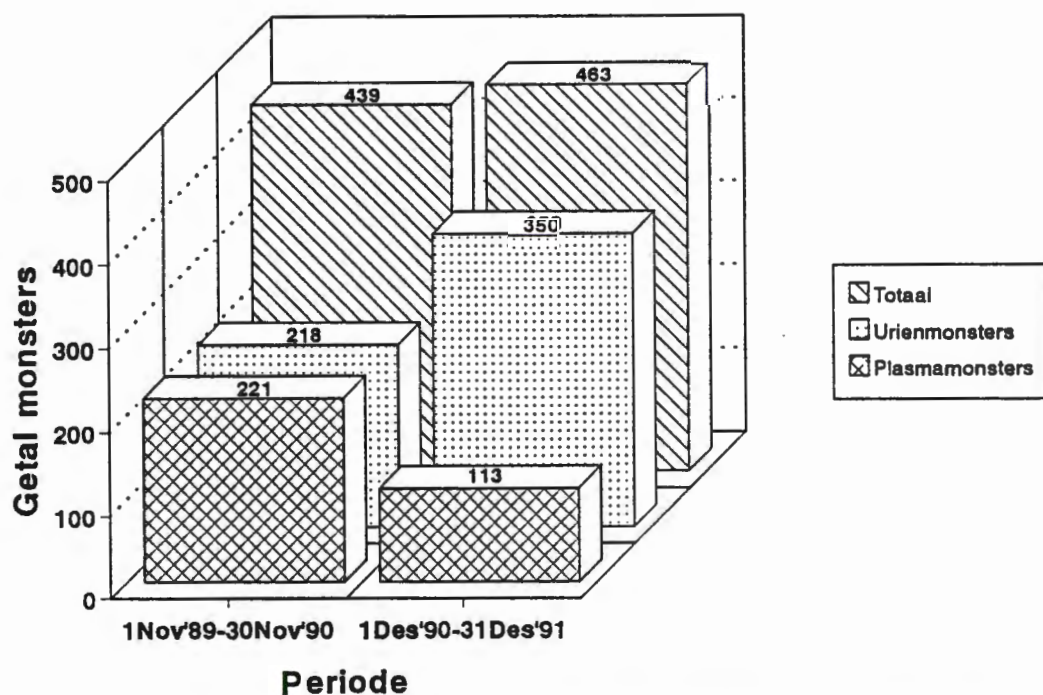


Fig 3.10 Uiteensetting van die aard en hoeveelheid monsters wat in die onderskeie periodes met behulp van outomatiese aminosuuranalise gekwantifiseer is.

Tabel 3.2 Tipering van monsters wat met eendimensionele dunlaagchromatografie geanaliseer is

	1 Nov'89 - 30 Nov'90		1 Des'90 - 31 Des'91	
	Uriene	Plasma	Uriene	Plasma
Totaal	829	275	496	98
Normaal	624	219	389	74
Abnormaal	205	56	107	24
% Abnormaal	24.7	20.4	21.6	24.5

Monsters wat een of ander abnormaliteit na dunlaagchromatografie getoon het, is verder met behulp van 'n outomatiese aminosuuranaliseerder geanaliseer. In sommige gevalle is kwantitatiewe analyses spesifiek deur die patoloog of geneesheer aangevra. Oor 'n tydperk van twee jaar is die aminosuurkonsentrasies in 902 monsters bepaal (Figuur 3.10). Die 439 monsters, wat in die periode 1 November 1989 tot 30 November 1990 gekwantifiseer is, was van 324 pasiënte afkomstig. Daarenteen is die aminosuurinhoud in 463 fisiologiese monsters van 361 pasiënte in die periode 1 Desember 1990 tot 31 Desember 1991 gekwantifiseer. Tabel 3.3 tipeer die monsters wat aan kwantitatiewe aminosuuranalise onderwerp is.

Tabel 3.3 Tipering van monsters wat aan kwantitatiewe aminosuuranalise onderwerp is

	1 Nov'89 - 30 Nov '90		1 Des'90 - 31 Des'91	
	Uriene	Plasma	Uriene	Plasma
Totaal	218	221	350	113
Normaal	134	121	266	62
Abnormaal	84	100	84	51
% Abnormaal	38.5	45.2	24	45.1

Die belang van die benadering wat in hierdie studie gevolg is, lê daarin dat die resultate van die twee analitiese tegnieke nie los van mekaar staan nie. Alle abnormaliteite wat op die dunlae waargeneem is, is met behulp van kwantitatiewe aminosuuranalise geverifieer. Dit was eers moontlik om na kwantitatiewe analise tot 'n finale diagnose te kom. In sommige gevalle het dit gelyk asof 'n spesifieke aminosuur in verhoogde konsentrasie op die dunlaagchromatogram teenwoordig was, maar na kwantifisering was die aminosuurkonsentrasie slegs effens verhoog of selfs normaal. Oor die tydperk van twee jaar het 35.37 % van die monsters wat aan kwantitatiewe aminosuuranalise onderwerp is, abnormaliteite getoon. Die abnormaliteite wat in hierdie tydperk waargeneem is, kon in slegs 15 gevalle aan 'n defek in die aminosuurmetabolisme toegeskryf word. In die tydperk waarin die studie onderneem is, is sewe verskillende siektetoestande gediagnoseer. 'n Uiteensetting van die waargenome siektetoestande asook die aantal gevalle word in Tabel 3.4 weergegee. Hierdie siektetoestande was die gevolg van verskillende soorte defekte van die aminosuurmetabolisme. Verskeie aminosuururieë, wat die gevolg van 'n **kataboliese** defek is, is opgespoor. 'n Aminosuururie wat die gevolg van defektiewe **transport** is, is ook aangetoon, asook 'n siektetoestand wat veroorsaak is deur 'n defek in die regenerering van 'n **kofaktor**.

Tabel 3.4 Uiteensetting van die tipe en aantal aminosuurafwykings wat oor 'n tydperk van twee jaar waargeneem is

Siektetoestand	Aantal pasiënte
Histidienemie	1
Hipermetionienemie	1
Tirosienemie	4
Hartnup se siekte	2
Hiperlisienemie	1
Hiperornitienemie	1
Hiperfenielalanienemie	5

Die gedeelte wat hierna volg, gee 'n kort uiteensetting van die resultate wat uiteindelik tot 'n pertinente diagnose gelei het. Aangesien elk van die siektetoestande nie breedvoerig behandel word nie, word die moontlike defekte wat in die verskillende siektetoestande resulteer, slegs kortliks genoem. In Hoofstuk 5 word een van die pasiënte, wat met hiperfenielalanienemie gediagnoseer is, egter in detail bespreek.

3.4 WAARGENOME AMINOSUURURIEË

3.4.1 Histidienemie

Verhoogde urinêre uitskeiding van histidien is by 'n veertienjarige pasiënt opgemerk. 'n Duidelike band, wat histidien verteenwoordig, was op die dunlaag sigbaar (Figuur 3.5, baan 1). Hierdie resultaat is bevestig deur die histidieninhoud van die betrokke monster te kwantifiseer. Figuur 3.11 toon die chromatogram wat na kwantitatiewe aminosuuranalise verkry is.

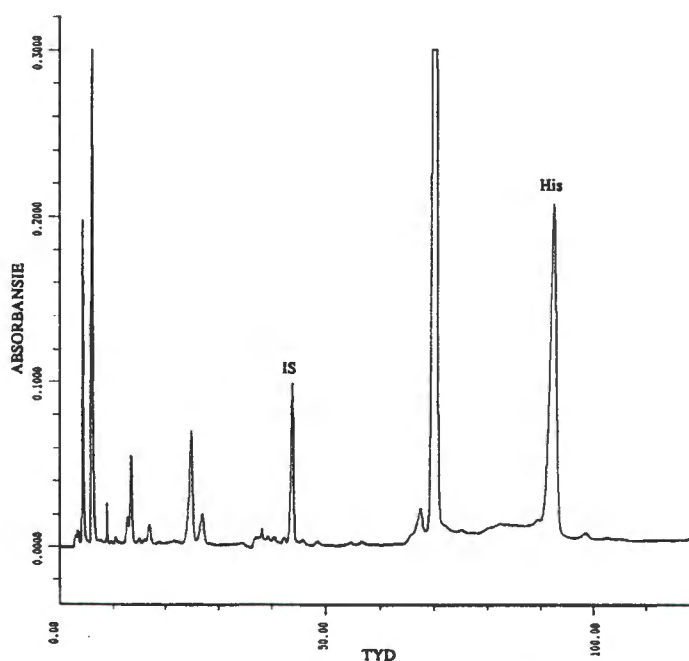


Fig. 3.11 Aminosuurprofiel van 'n histidienemiepasiënt. Die histidienvlak in hierdie urienmonster was 4.75 mmol/g kreatinien.

Die duidelike piek aan die regterkant van die chromatogram is die gevolg van die hoë konsentrasie histidien wat in die monster teenwoordig is. In teenstelling met die normale waardes van 0.574 ± 0.345 mmol/g kreatinien (Bremer *et al.*, 1981), was die histidienkonsentrasie in hierdie monster 4.754 mmol/g kreatinien.

Histidienemie dui op 'n outosomaal resessiewe defek van die histidienmetabolisme, wat lei tot verhoogde histidienkonsentrasies in die bloed, asook verhoogde urinêre uitskeiding van die aminosuur. Die biochemiese abnormaliteite is die gevolg van 'n defek in die histidase-ensiem (Levy, 1989a). Histidase kataliseer die eerste reaksie in die kataboliese weg van histidien en 'n defek in hierdie ensiem lei tot die akkumulاسie van histidien asook die produkte van die histidientransaminasereaksie (Figuur 3.12).

3.4.2 Hiperornitienemie

Dunlaagskeiding van 'n baba van elf maande oud se urinêre aminosure het op 'n moontlike abnormaliteit gedui (Figuur 3.5, baan 2). Aanvanklik was dit nie duidelik watter aminosuur die prominente band op die dunlaag veroorsaak het nie, aangesien sommige van die bande tot soveel as vier aminosure verteenwoordig. Kwantifisering van die monster se aminosuurinhoud het 'n verhoogde ornitienkonsentrasie van 8.742 mmol/g kreatinien uitgewys (Figuur 3.13). Volgens Bremer *et al.* (1981) behoort ornitien slegs in spoorhoeveelhede tot 'n maksimum van 0.48 mmol/g kreatinien in babas se uriene uitgeskei te word.

Valle en Simell (1989) wys daarop dat twee afsonderlike siektetoestande met hiperornitienemie geassosieer word: kringvormige atrofie van die choroïed en retina, sowel as die hiperornitien-hiperammoniak-homositrullienurie-sindroom (HHH-sindroom). Kringvormige atrofie van die choroïed en retina is 'n outosomaal resessiewe defek wat die gevolg van 'n gebrek aan ornitien- δ -aminotransferase is. Die HHH-sindroom is moontlik die gevolg van 'n defek in die transport van ornitien oor die mitochondriale membraan.

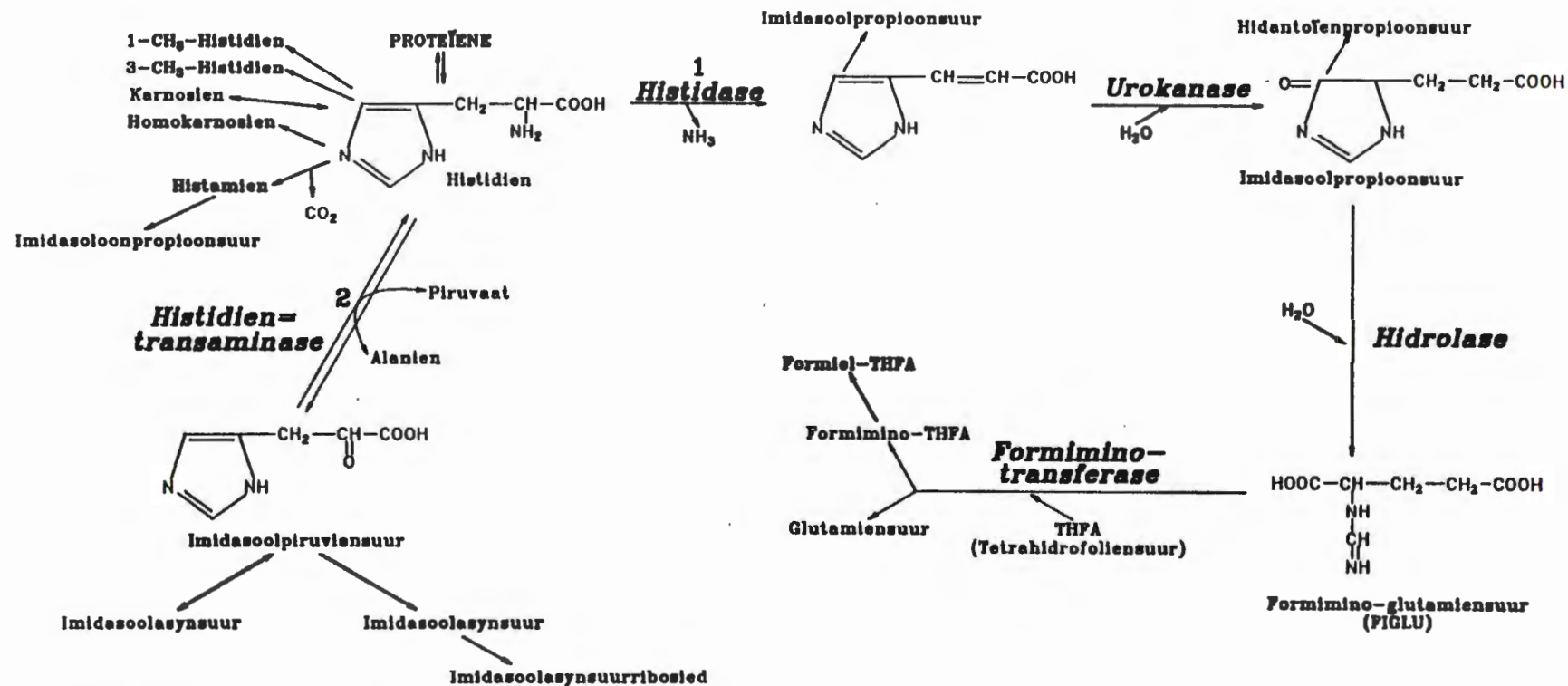


Fig. 3.12 Kataboliese weë vanaf histidien. Histidien word hoofsaaklik via urokanoësuur (1) gekataboliseer om glutamiensuur te lewer. In histidienemie speel histidientransaminase (2) 'n belangrike rol in die afbraak van histidien en lei tot die vorming van imidasoolmetaboliete (Ontleen aan Levy, 1989a).

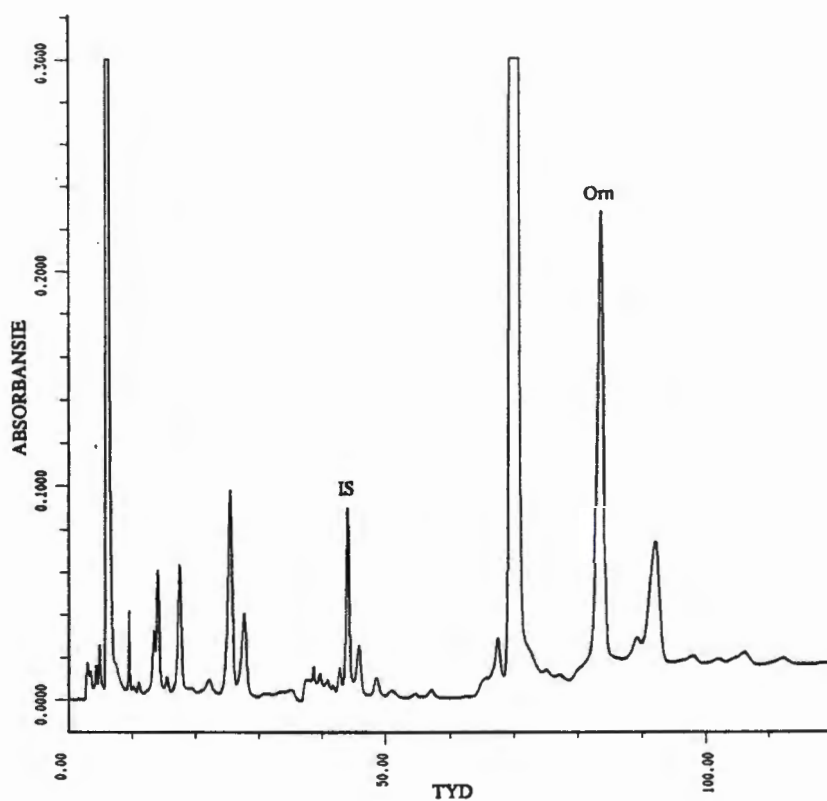


Fig. 3.13 Verhoogde urinêre uitskeiding van ornitien by 'n pasiënt met hiperornitienemie.

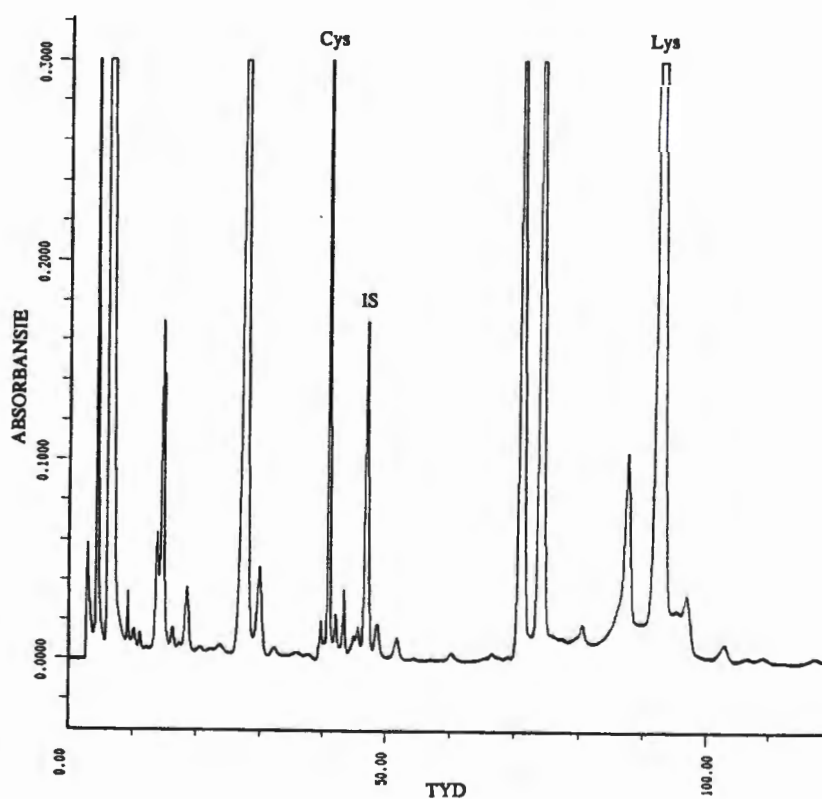


Fig. 3.14 Urinêre uitskeidingspatroon van aminosure by 'n pasiënt met hiperlisienemie.

3.4.3 Hiperlisienemie

Verhoogde urinêre uitskeiding van lisien is by twee pasiënte aangetoon. Pasiënt A was 'n pasgebore babaseuntjie wat na 'n paar dae oorlede is. 'n Ongewone skeidingspatroon van urinêre en plasma aminosure is na dunlaagchromatografie opgemerk (Figuur 3.5, bane 6 en 13). Die plasmalisieninhoud was effens verhoog, tot twee maal die normale vlakke, terwyl die konsentrasies van die ander aminosure binne normale grense was. Daarenteen was die aminosuurprofiel van die pasiënt se uriene hoogs abnormaal; die chromatogram in Figuur 3.14 toon duidelik dat beide lisien en sistien in verhoogde konsentrasies teenwoordig was, wat moontlik op 'n geval van sistienlisienurie kon dui. Aangesien die sistienvlakke egter nie in die plasma verhoog was nie, is die toestand in pasiënt A as hiperlisienemie gediagnoseer. Die ander pasiënt was 'n vyftienjarige meisie en het ook groot hoeveelhede lisien en sistien in die uriene uitgeskei. Ongelukkig was dit nie moontlik om 'n plasmamonster van die pasiënt te bekom nie, sodat 'n finale diagnose nie moontlik was nie.

Twee verbonde ensieme, sakkaropiendehidrogenase en lisien-ketoglutaatreduktase, inisieer normaalweg die kataboliese afbraak van lisien (Figuur 3.15).

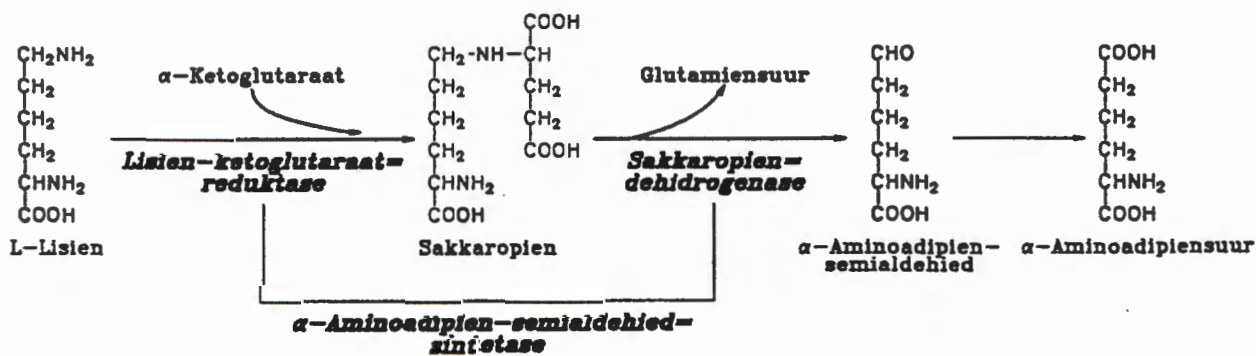


Fig. 3.15 Kataboliese afbraak van lisien. 'n Defek in die bifunksionele ensiem, wat by die katabolisme van lisien betrokke is, lei tot hiperlisienemie (Ontleen aan Dancis & Cox, 1989).

'n Defek in hierdie bifunksionele ensiem, wat ook as α -aminoadipeen-semialdehydesintetase bekend staan, lei tot die outosomaal resessiewe siektetoestand, hiperlisienemie (Dancis & Cox, 1989).

3.4.4 Hipermetionienemie

'n Abnormale skeidingspatroon van urinêre aminosure is na dunlaagchromatografie by 'n pasiëntmonster opgemerk (Figuur 3.5, baan 8). Kwantifisering van die monster se aminosuurinhoud het op verhoogde vlakke van metionien gedui (Figuur 3.16). Die metionienkonsentrasie van hierdie monster was 8.270 mmol/g kreatinien, terwyl dit normaalweg by volwassenes slegs in spoorhoeveelhede teenwoordig is en by babas 'n maksimum van 0.19 mmol/g kreatinien mag bereik. Ongelukkig was geen inligting oor die betrokke pasiënt beskikbaar nie. Aangesien waardes gewoonlik met normaalwaardes van dieselfde ouderdomsgroep vergelyk word, was dit onmoontlik om die mate van verhoging in hierdie monster te bepaal.

Die eerste stap in die katabolisme van metionien is die omskakeling van metionien na S-adenosielmetionien deur die ensiem, metionien-adenosieltransferase. 'n Onvermoë tot hierdie omskakeling lei tot die akkumulasie van metionien in liggaamsvloeistowwe en dit staan as hipermetionienemie bekend (Mudd *et al.*, 1989).

3.4.5 Hartnup - siekte

By twee pasiënte, 'n blanke seuntjie van vier maande en 'n swart babadogtertjie van drie weke, is skeidingspatrone van urinêre aminosure verkry waarin al die bande op die dunlaag baie intens was (Figuur 3.5, baan 6). Hierdie resultaat het op Hartnup-siekte gedui. Kwantifisering van Hartnup-pasiënte se urinêre aminosuurinhoud is onnodig, aangesien die mate van verhoging nie diagnostiese waarde inhou nie. Ter illustrasie van die hoogs abnormale urinêre aminosuurprofiel wat by Hartnup-pasiënte voorkom, word sodanige aminosuurprofiel in Figuur 3.17 getoon.

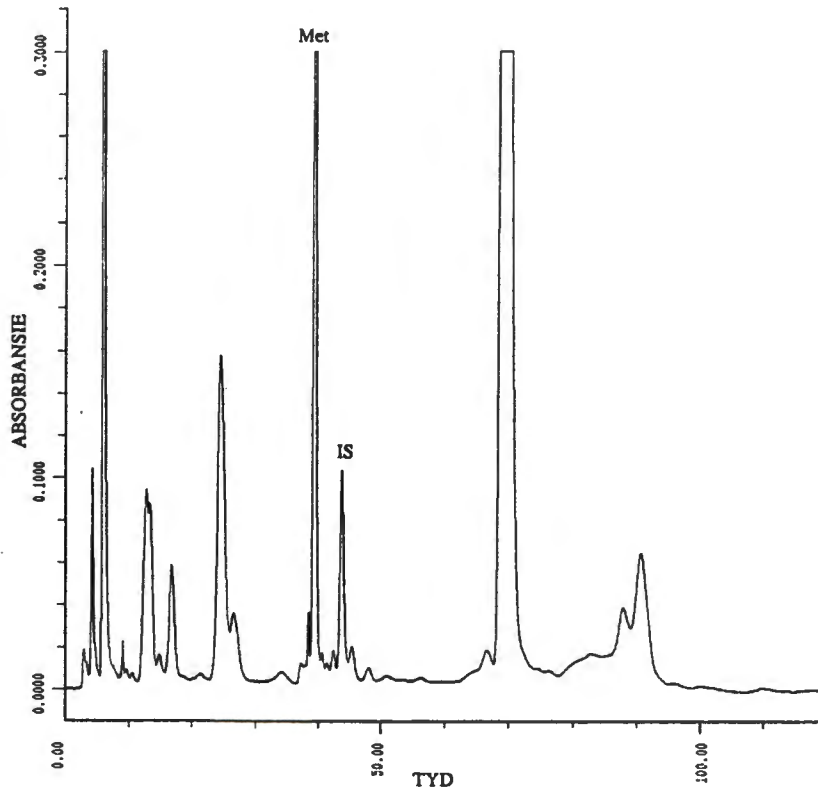


Fig. 3.16 Aminosuurprofiel van 'n pasiënt wat groot hoeveelhede metonien in die uriene uitskei.

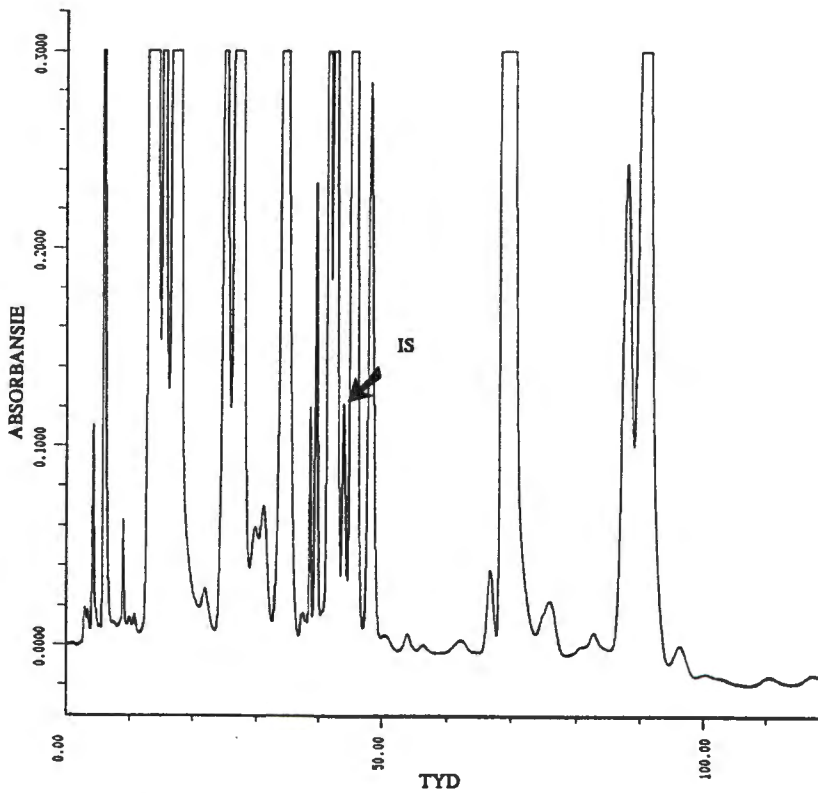


Fig. 3.17 Profiel van aminosure wat in die uriene van Hartnup-pasiënte voorkom.

Hartnup-siekte is 'n outosomaal resessiewe defek van die transport van neutrale aminosure, wat deur 'n bepaalde hiperaminozuururie gekenmerk word (Levy, 1989c). Hierdie siekte word moontlik deur 'n genetiese defek veroorsaak wat lei tot verminderde renale herabsorpsie van 'n groep aminosure wat dieselfde, en in hierdie geval 'n defektiewe transportsisteen gebruik (Wilcken *et al.*, 1977 ; Mahon & Levy, 1986). Die karakteristieke patroon van neutrale hiperaminozuururie is 'n blywende verskynsel en dit word beskou as 'n vereiste vir diagnose. Hartnup-pasiënte skei ook hoë konsentrasies indoliese komponente uit.

3.4.6 Tirosienemie

Abnormale akkumulasie van tirosien in plasma en uriene is op die dunlaagskeidings van vier pasiënte opgemerk. Figuur 3.5, baan 14 toon 'n voorbeeld van so 'n skeiding. Twee van die pasiënte het gesterf voordat verdere toetse gedoen kon word om tussen die verskillende vorme van die siekte te onderskei. Die toestand in een van die pasiënte, 'n vroeggebore baba, is as oorganklike neonatale tirosienemie gediagnoseer, aangesien die aanvanklike hoë tirosienvlakke na afloop van 'n kort periode genormaliseer het. Die teenwoordigheid p -hidroksie-fenoliese sure in die uriene van die vierde pasiënt het tot die diagnose van tirosienemie tipe II gelei.

Akkumulasie van tirosien in liggaamsvloeistowwe kan die gevolg van twee moontlike ensiemdefekte wees (Figuur 3.18). Tirosienemie tipe I is 'n aangebore defek van die ensiem fumarielasetoasetaatidrolase. Tirosienemie tipe II is 'n outosomaal resessiewe defek van die hepatiese ensiem tirosienaminotransferase (Goldsmith & Laberge, 1989). Beide toestande word deur verhoogde urinêre uitskeiding van tirosien en sy metaboliete gekenmerk, maar die teenwoordigheid van suksinielasetoon en suksinielasetoasetaat is 'n vereiste vir die bevestiging van tirosienemie tipe I. Volgens Bremer *et al.* (1981) is oorganklike neonatale tirosienemie die gevolg van onderontwikkelde lewerensieme by pasgebore babas. Verhoogde vlakke van tirosien kom in beide die plasma en die uriene voor, maar die biochemiese parameters normaliseer sodra die ensieme normaalweg tot uitdrukking kom.

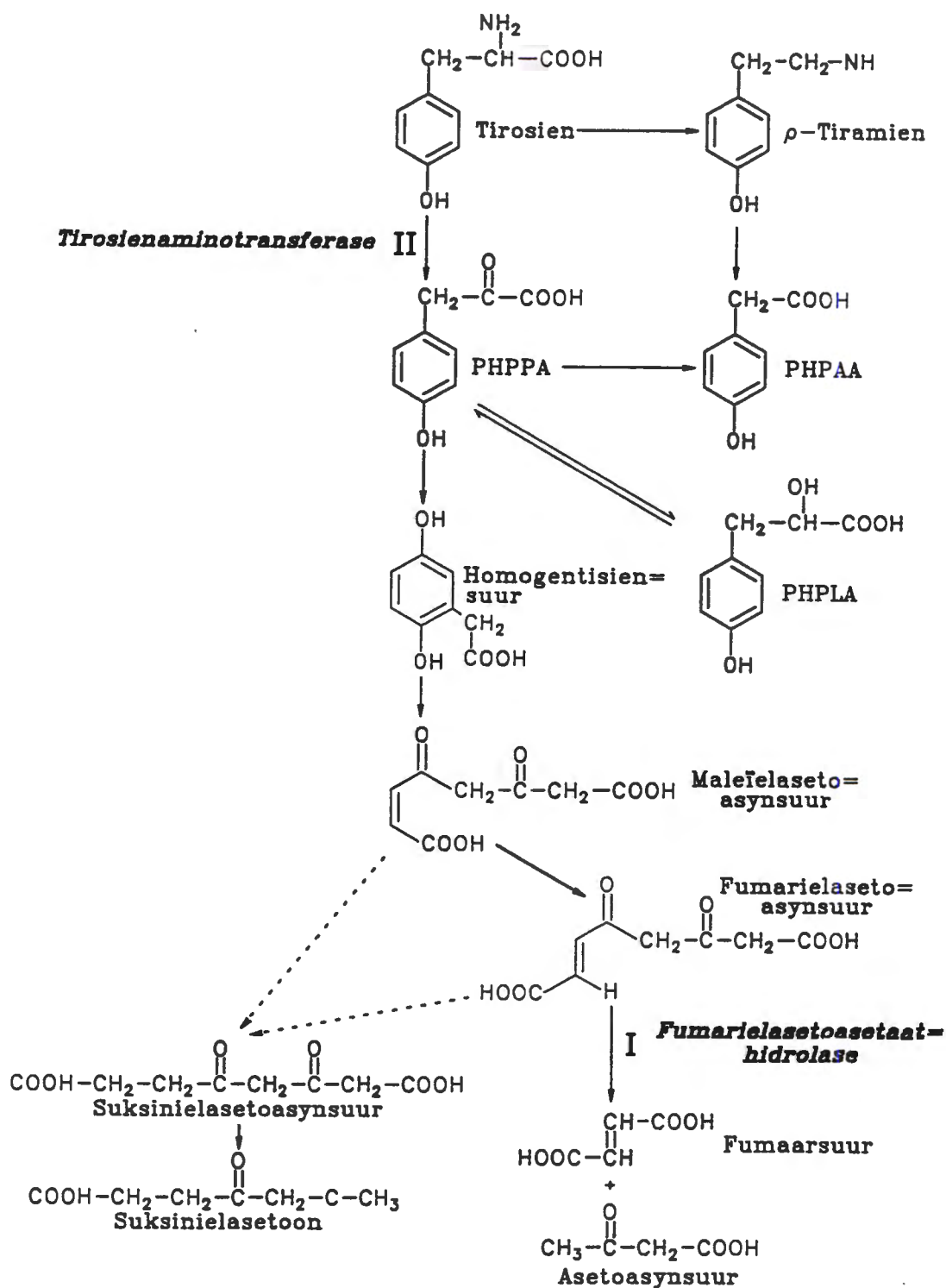


Fig. 3.18 Katabolisme van tirosien. Die twee ensiemdefekte wat tot tirosienemie lei word soos volg aangedui : I = Fumarielasetoasetaat-hidrolase, die defekte ensiem by tirosienemie tipe I; II = tirosienaminotransferase, die defekte ensiem by tirosienemie tipe II (Ontleen aan Goldsmith & Laberge, 1989).

3.4.7 Hiperfenielalanienemie

In die tydperk waarin die studie onderneem is, is ses moontlike gevalle van hiperfenielalanienemie (HPA) opgespoor. By elk van die monsters wat van hierdie pasiënte ontvang is, is 'n duidelike fenielalanienband na eendimensionele dunlaagchromatografie van die fisiologiese aminosure op die dunlaag waargeneem. In Figuur 3.5, bane 5 en 12 word onderskeidelik 'n urien- en plasmamonster van 'n HPA-pasiënt getoon.

Op grond van die plasma aminosuurvlakke, wat groter as 1.2 mM was, is die toestand in drie van die pasiënte as fenielketonurie (PKU) gediagnoseer. Een van die pasiënte, 'n ses-en-twintigjarige swart man met ernstige neurologiese afwykings, het 'n plasmafenielalanienkonsentrasie van 0.258 mM gehad. In vergelyking met die normaalwaardes van 0.065 ± 0.009 mM was dit abnormaal hoog. Hierdie pasiënt het egter gesterf voordat die toestand geverifieer kon word. 'n Vyfjarige Sjinese seuntjie se urinêre uitskeiding van fenielalanien was ongeveer vyf maal hoër as dié van normale kinders van dieselfde ouderdomsgroep. Sy plasmafenielalanienvlakke was slegs effens verhoog en hy het negatief op 'n fenielalanienbeladingstoets gereageer.

Die sesde pasiënt was om twee redes buitengewoon : eerstens het haar plasmafenielalanienkonsentrasie tussen 0.466 mM en 0.624 mM gewissel, wat heelwat hoër as normaal is, maar tog aansienlik laer as dié van tipiese PKU-pasiënte. Verder was die pasiënt 'n swart babadogtertjie en volgens beskikbare inligting die eerste bekende geval van HPA onder die swart populasie in die Republiek van Suid-Afrika. Figuur 3.19 toon 'n plasma-aminosuurprofiel van hierdie pasiënt toe haar fenielalanienvlakke 0.624 mM was in teenstelling met die normaalwaardes van 0.023 - 0.069 mM. Diagnose van die presiese aard van hiperfenielalanienemie by hierdie pasiënt word volledig in Hoofstuk 5 behandel.

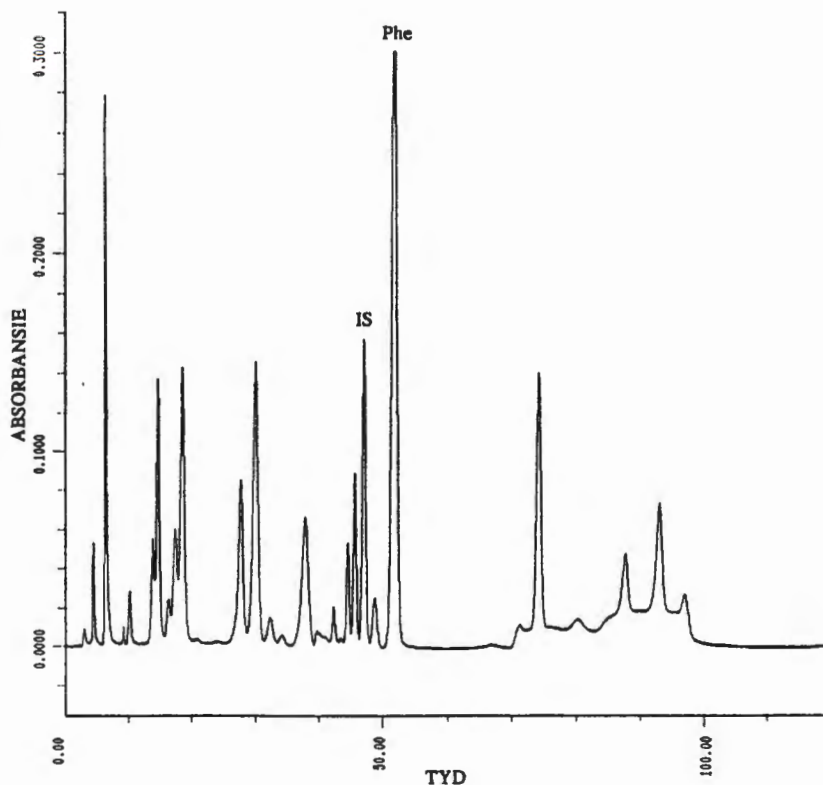


Fig. 3.19 Plasma-aminosuurprofiel van 'n HPA-pasiënt na outomatiese aminosuuranalise.

3.5 ATIEPIESE KOMPONENTE IN URIENMONSTERS

Sommige urienmonsters wat met behulp van dunlaagchromatografie nagegaan is, het onbekende bande getoon wat nie met bekende aminosure ooreenstem nie. Hierdie bande, wat ninhidrien positiewe komponente verteenwoordig, is slegs by sommige monsters opgespoor en kom nie by die standaardmengsel voor nie. Figuur 3.5, baan 9 toon 'n urienmonster met 'n onbekende band nadat dit met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie geanaliseer is.

In die tydperk 1 November 1989 tot 30 November 1990 het atipiese bande by ongeveer 11 % van die urienmonsters voorgekom, terwyl dit by sowat 16 % van die urienmonsters teenwoordig was wat in die tydperk 1 Desember 1990 tot 31 Desember 1991 getoets is (Tabel 3.5).

Tabel 3.5 Aantal urienmonsters met atipiese ninhidrien positiewe bande

Tydperk	Totale aantal monsters	Aantal monsters met atipiese band(e)	Persentasie monsters met atipiese band(e)
1 November '89 - 30 November '90	829	88	10.62
1 Desember '90 - 31 Desember '91	496	79	15.93

3.6 SAMEVATTING

Om die voorkoms van defekte van die aminosuurmetabolisme in hoërisiko pasiënte te ondersoek, is fisiologiese monsters van 1443 geselekteerde pasiënte vir biochemiese abnormaliteite nagegaan. Daar is hoofsaaklik op neonatale en pediatriese pasiënte met ongewone kliniese simptome gekonsentreer. 'n Uiteensetting van simptome wat moontlik op metaboliese defekte kon dui en gevolglik as verwysingskriteria vir die verwysende geneeshere gedien het, word in Tabel 3.6 vervat.

Tabel 3.6 Kriteria vir die verwysing van hoërisiko pasiënte

1. Ketose	11. Hepatomegalie
2. Metaboliese asidose	12. Abnormale vel/hare
3. Hipoglisemie	13. Selfverminking
4. Hiperammonemie	14. Spierhipertonie/hipotonie
5. Slaperigheid/koma	15. Vertraagde ontwikkeling
6. Stuiptrekkings/aanvalle	16. Neurologiese agteruitgang
7. Eienaardige reuk	17. Verstandelike vertraging
8. Aanhoudende braking	17. Vroeggeboorte
9. Voedingsprobleme	19. "Wiegiedood"
10. Blywende onverklaarde geelsug	20. Familiëgeskiedenis van aangebore metaboliese siektetoestande

'n Tweeledige siftingsprotokol is gevolg. As eerste benadering is alle fisiologiese monsters met eendimensionele dunlaagchromatografie getoets, waarna moontlike abnormales aan outomatiese aminosuuranalise onderwerp is. Deur van 1D DLC gebruik te maak, kon die aminosuuriinhoud van die pasiëntmonsters kwalitatief met bekende standaarde, asook normale profiele vergelyk word, terwyl kwantitatiewe aminosuuranalise akkurate konsentrasiebepalings moontlik gemaak het.

Byna 'n kwart (23 %) van al die fisiologiese monsters wat oor twee jaar getoets is, het abnormale dunlaagchromatogramme opgelewer. Ongeveer 35 % van die monsters wat met behulp van outomatiese aminosuuranalise gekwantifiseer is, het op abnormale aminosuurkonsentrasies gedui. In sommige gevalle soos hiperfenielalanienemie was 'n enkele aminosuur in verhoogde konsentrasie teenwoordig, maar in ander gevalle soos Hartnup se siekte en hiperlisienemie was verhogings in 'n kombinasie van aminosure van diagnostiese belang. Alhoewel 319 monsters abnormaliteite met betrekking tot aminosuuriinhoud getoon het, kon hierdie abnormaliteite in slegs 15 gevalle aan bekende defekte van die aminosuurmetabolisme gekoppel word. Hierdie 15 gevalle verteenwoordig effens meer as 1 % van die 1443 pasiënte wat oor die tweejaartydperk getoets is. Tabel 3.7 tipeer die opgespoorde siektetoestande in volgorde van hoogste insidensie.

Tabel 3.7 Opgespoorde defekte van die aminosuurmetabolisme

Siektetoestand	Aantal pasiënte
Hiperfenielalanienemie	5
Tirosienemie	4
Hartnup se siekte	2
Hiperlisienemie	1
Histidienemie	1
Hiperornitienemie	1
Hipermetionienemie	1

Tydens hierdie studie is sewe verskillende siektetoestande gediagnoseer. Hiperfenielalanienemie het die hoogste insidensie getoon, wat deur tirosienemie gevolg is.

Van die 1325 urienmonsters wat getoets is, het 12.6 % atipiese ninhidrien positiewe bande getoon. Die teenwoordigheid van hierdie bande is nie met 'n verhoging in die aminosuurinhoud geassosieer nie, aangesien hul posisie op die dunlaagskeidings nie met dié van bekende fisiologiese aminosure ooreengestem het nie.

Hierdie studie het interessante resultate opgelewer en veral twee dinge het uitgestaan:

- i) die hoë voorkoms van atipiese ninhidrien positiewe komponente in urienmonsters, en
- ii) 'n ongewone geval van hiperfenielalanienemie by 'n jong swart pasiënt.

Die volgende twee hoofstukke word daaraan gewy om hierdie twee ongewone verskynsels van nader te ondersoek. In Hoofstuk 4 word die aard en oorsprong van die atipiese bande nagegaan. Hoofstuk 5 handel oor die presiese aard van hiperfenielalanienemie by die swart gesin.

HOOFSTUK 4

DIE EFFEK VAN PENISILLINE OP DIE ONTSTAAN VAN ATIEPIESE NINHIDRIEN POSITIEWE KOMPONENTE

4.1 INLEIDING

Die resultate wat met behulp van dunlaagchromatografie en kwantitatiewe aminosuuranalise verkry word, kan deur 'n verskeidenheid faktore beïnvloed word. Toediening van medikasie, dieetterapie, chemiese behandeling of veroudering van monsters, asook hipersensitiwiteit van metodes kan resultate lewer wat aangebore metabolisme defekte "naboots" (Hill *et al.*, 1976). In Afdeling 3.5 is daar melding gemaak van atipiese komponente wat tydens hierdie studie in sommige urienmonsters aangetref is. Van die 1325 urienmonsters wat oor 'n tweejaartydperk vir abnormaliteite van die aminosuurmetabolisme getoets is, het 12.6 % van die monsters ongewone ninhidrien positiewe bande getoon. Die dunlaagskeidingspatrone van hierdie urienmonsters het nie met dié van normale urienmonsters ooreengestem nie, aangesien addisionele bande aan die bokant van die dunlaagchromatogramme voorgekom het. Verder kon die skeidingspatrone van hierdie urienmonsters na dunlaagchromatografie en kwantitatiewe aminosuuranalise nie aan bekende defekte van die aminosuurmetabolisme gekoppel word nie. Hierdie hoofstuk ondersoek die aard en oorsprong van die atipiese bande. Verskeie benaderings en analitiese tegnieke wat gevolg is, word bespreek.

4.2 EENDIMENSIONELE DUNLAAGCHROMATOGRAFIE EN KWANTITATIEWE AMINOSUURANALISE

In Hoofstuk 3 is daar genoem dat daar van beide eendimensionele dunlaagchromatografie en kwantitatiewe aminosuuranalise gebruik gemaak is om vir

defekte van die aminosuurmetsbolisme te toets. Hierdie afdeling handel oor die toepassing van bogenoemde twee analitiese tegnieke om die aard van die atipiese bande na te gaan. Eendimensionele dunlaagchromatografie is die eerste analitiese tegniek wat aangewend is om die aard van die onbekende bande te ondersoek. Alle monsters is volgens die chromatografiese prosedure wat in Afdeling 3.2.1 uiteengesit is, geanaliseer om 'n kwalitatiewe aanduiding van die aminosuurninhoud te kry. Die meerderheid van die urienmonsters wat atipiese bande getoon het, het 'n enkele band aan die bokant van die chromatogram bevat, maar daar was ook verskeie monsters wat twee onbekende bande bevat het. Deur die urinêre aminosuurskeidingspatroon van 'n normale urienmonster na dunlaagchromatografie (Figuur 3.5, baan 3) met dié van 'n urienmonster met atipiese bande (Figuur 3.5, baan 9) te vergelyk, lyk laasgenoemde opvallend abnormaal. Hierdie spesifieke urienmonster toon twee duidelike ninhidrien positiewe bande aan die bokant van die chromatogram, wat nie by die normale urienmonster óf by die standaard aminosuurmengsel (Figuur 3.5 bane 4 en 11) voorkom nie.

Aangesien die atipiese ninhidrien positiewe bande aan die bokant van die chromatogramme voorkom, dui dit daarop dat die komponent(e) wat in die bande teenwoordig is, vinniger migreer as die aminosure in die standaardmengsel. Hieruit blyk dat die fisies-chemiese gedrag van die komponent(e) in die atipiese bande, onder die spesifieke kondisies, met dié van aminosure verskil. Vir die ninhidrienkleuringsreaksie om plaas te vind, moet die verbinding egter 'n vrye aminogroep bevat. Aangesien die atipiese bande baie duidelik met ninhidrien kleur, kan aanvaar word dat die komponent(e) wat daarin voorkom ook 'n vrye aminogroep bevat. Die meganisme van die betrokke kleuringsreaksie word in Figuur 4.1 getoon.

Tydens hierdie studie is monsters wat moontlike abnormaliteite na eendimensionele dunlaagchromatografie getoon het, verder met behulp van kwantitatiewe aminosuuranalise geanaliseer. Die toepassing van hierdie tegniek op monsters wat atipiese bande na dunlaagchromatografie getoon het, was daarop gemik om 'n aanduiding van die elueringsposisies van die onbekende ninhidrien positiewe komponente te verkry. 'n Volledige uiteensetting van die metode wat gebruik is, is

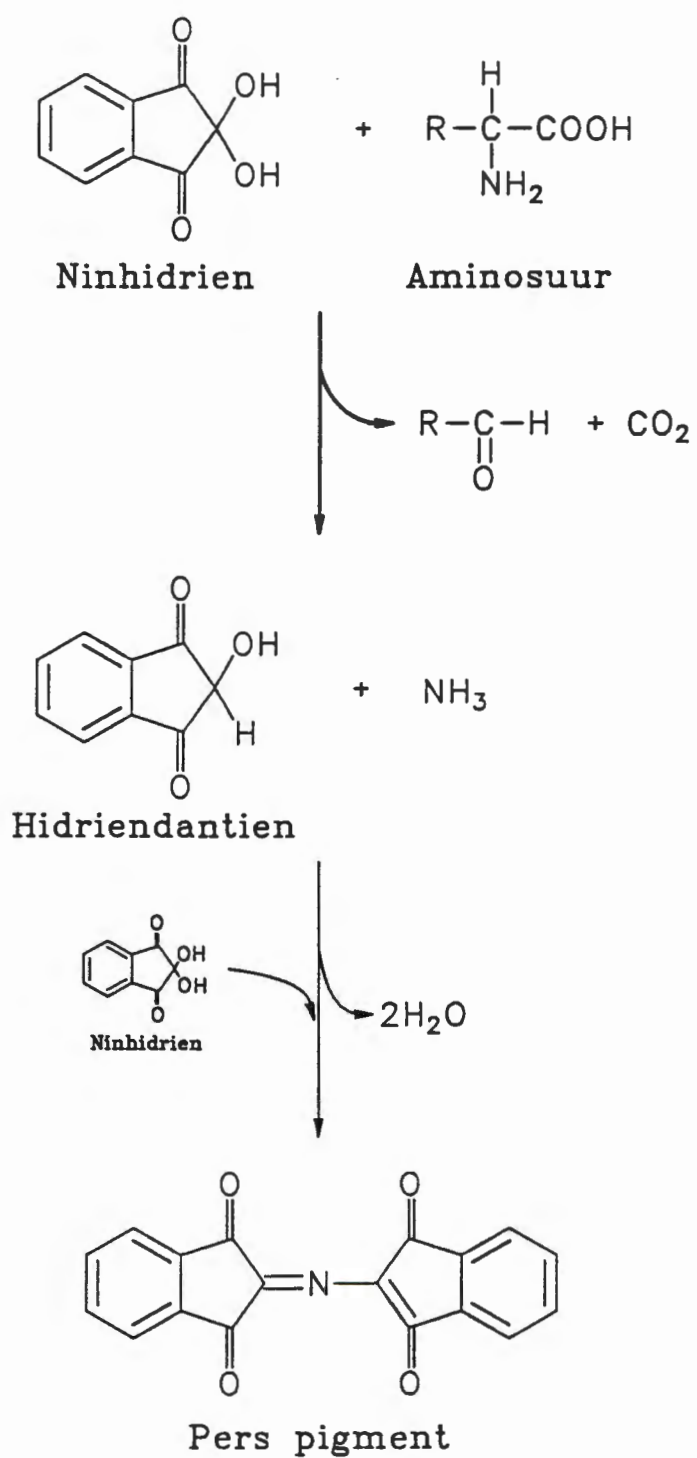


Fig. 4.1 Kleuringsreaksie van primêre aminosure met ninhidrien.

in Afdeling 3.2.2 uiteengesit. Op grond van die kwantitatiewe analises was die konsentrasies van bekende aminosure in die meerderheid monsters wat atipiese bande op dunlaagchromatogramme getoon het binne normale grense. Figuur 4.2 toon die aminosuurprofiel van 'n monster met atipiese ninhidrien positiewe komponente. Op hierdie spesifieke aminosuurprofiel is daar twee onbekende pieke waargeneem, wat op die figuur met pyle aangedui word. Die eerste onbekende piek elueer in die omgewing van β -amino-isobottersuur en die tweede elueer op dieselfde posisie as 3-metielhistidien en karnosien. Verder lyk dit ook asof 'n plat breë piek onder die swawelbevattende aminosure elueer. Die ontstaan van hierdie ongewone pieke word aan die komponent(e) in die atipiese bande toegeskryf. Alhoewel die elueringsposisies van die onbekende pieke ooreenstem met dié van bekende aminosure, kan daar op grond van die ongewone vorms van die pieke verwag word dat hulle moontlik nie aminosure verteenwoordig nie.

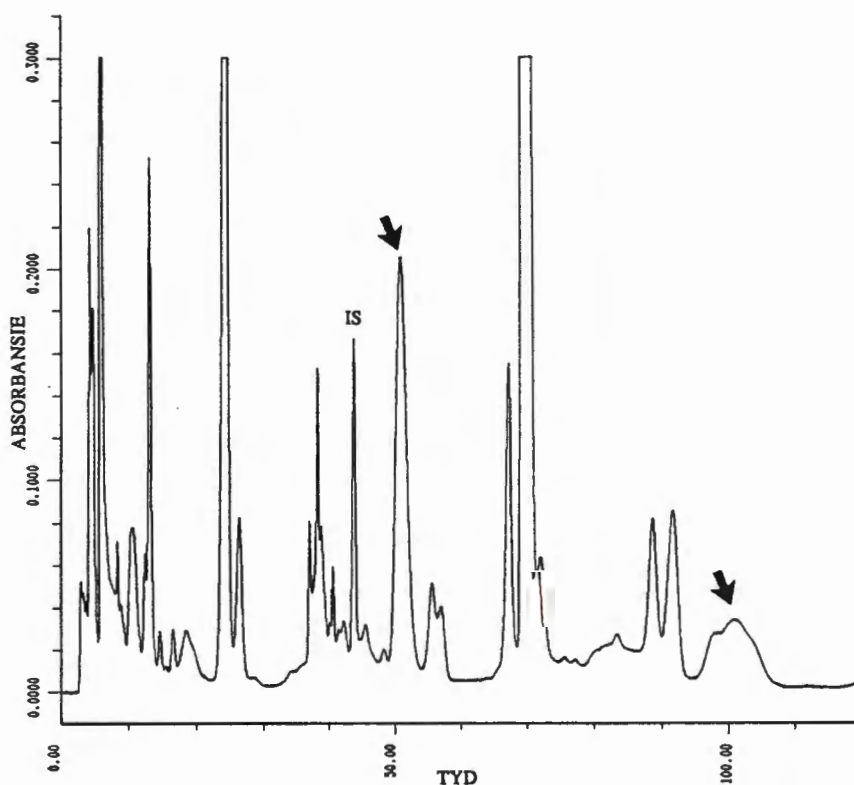


Fig. 4.2 Ongewone pieke op die kwantitatiewe aminosuurprofiel van 'n urienmonster wat atipiese ninhidrien positiewe bande na dunlaagchromatografie getoon het.

4.3 DOWEX - ISOLERING VAN AMINOSURE

Uriene is komplekse oplossings wat 'n groot verskeidenheid komponente bevat. Op grond van verskille in hul fisies-chemiese eienskappe kan die verskillende komponente deur middel van onder andere ionenuitruiling van mekaar geskei word. Ionenuitruiling is 'n proses waartydens ione met dieselfde lading tussen 'n oplossing en 'n onoplosbare vastestof uitgeruil word. Met behulp van ionenuitruilingschromatografie kan verskillende komponente wat in 'n oplossing voorkom van mekaar geskei word. Vir die isolering van aminosure uit uriene is Dowex as pakkingsmateriaal gebruik. Dowex 50 WX8 (H^+ -vorm) is 'n sterk suur kationuitruiler en gevolglik word basiese en neutrale aminosure op die harpui teruggehou, terwyl suur aminosure vrylik deurbeweeg.

Die metode van Bremer *et al.* (1981) is gebruik om aminosure uit 'n urienemonster wat atipiese ninhidrien positiewe bande na dunlaagchromatografie getoon het, te isoleer. Ses milliliter uriene is met 'n 10 g% (m/v) sulfosalisielsuuroplossing gedeproteïeneer (100 μl sulfosalisielsuur/ml uriene). Die presipitaat is vir 15 minute by 11 000 opm in 'n Eppendorf sentrifugeerder afgeswaai en die supernatant is vir verdere stappe gebruik. 'n Kolom met 'n deursnee van 7 mm en 'n lengte van ongeveer 120 mm is met Dowex 50 WX8 gevul. Die gedeproteïeneerde uriene is bo-op die pakkingsmateriaal gelaai en met 100 ml water deurgewas. Hierdie eluaat, wat die suur aminosuurfraksie bevat, is versamel en vir verdere gebruik bewaar. Dertig milliliter van 'n 2 M ammoniakoplossing is vir die eluering van basiese, neutrale en swak suur aminosure gebruik. Beide aminosuurfraksies is gevriesdroog, waarna elk van die residue in 1 ml water opgelos is. Hierdie oplossings is volgens die chromatografiese prosedure in Afdeling 3.2.1 vir die teenwoordigheid van die atipiese ninhidrien positiewe bande nagegaan. Die gekonsentreerdheid van die oplossings is buite rekening gelaat en 'n konstante volume van 10 μl is per dunlaagskeiding aangewend.

Die dunlaagskeidingspatroon van die ammoniakfraksie het verskeie ninhidrien positiewe bande getoon. Hierdie bande het met bekende aminosure ooreengestem en

geen atipiese bande was aan die bokant van die chromatogram teenwoordig nie. 'n Enkele ninhidrien positiewe band was op die dunlaagskeiding van die waterfraksie sigbaar. Hierdie enkele band het egter in die middel van die chromatogram voorgekom en dus nie met die posisie van die atipiese bande ooreengestem nie. Daar is verskeie moontlike redes waarom die atipiese ninhidrien positiewe bande na Dowex- suiwering nie met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie opgespoor kon word nie. Hierdie metode is spesifiek vir die isolering van aminosure en aangesien die atipiese ninhidrien positiewe komponent(e) nie in die aminosuurfraksies teenwoordig is nie, is die komponent(e) wat daarin voorkom moontlik nie aminosure nie. Dit is ook moontlik dat die komponent(e) op die kolom teruggehou word. Verder bestaan die moontlikheid dat die atipiese ninhidrien positiewe komponent(e) onstabiel is onder die spesifieke elueringskondisies. Hierdie resultate ondersteun dié in Afdeling 4.2, naamlik dat die fisies-chemiese eienskappe van die komponent(e) wat in die atipiese bande teenwoordig is nie met dié van bekende aminosure ooreenstem nie.

4.4 EKSTRAKSIE VAN ORGANIESE SURE

Aangesien die atipiese ninhidrien positiewe komponente nie met behulp van Dowex - suiwering saam met die aminosure geïsoleer kon word nie, moes daar van 'n ander tegniek gebruik gemaak word. Buiten aminosure kom daar ook organiese sure en ander metaboolkomponente in uriene voor. Aminosure besit verskillende gelaaide groepe en is gevolglik goed oplosbaar in polêre oplosmiddels soos water en etanol, maar onoplosbaar in nie-polêre oplosmiddels soos eter en benseen (Murray *et al.*, 1988). Organiese sure is op hul beurt weer goed oplosbaar in nie-polêre organiese oplosmiddels.

Die ekstraksiestelsels is so gekies dat die organiese sure en die aminosure wat in die uriene teenwoordig is van mekaar geskei word. Op grond van die verskille in oplosbaarheid word organiese sure in die organiese fase geëkstraheer, terwyl

aminosure in die waterige fase agterbly.

Een milliliter uriene is met 'n 5 M soutsuuroplossing tot pH 1 aangesuur. Ses milliliter koue etielasetaat is by die uriene gevoeg en vir ongeveer een uur in 'n skudmasjien geëkstraheer. Na sentrifugering is die etielasetaatfase na 'n ander buis oorgedra. Die oorblywende waterfase is daarna vir 10 minute met 3 ml koue diëtleter geëkstraheer. Na sentrifugering is die diëtleter afgetrek en met die etielasetaatfase gekombineer. Die gekombineerde organiese fases is met ongeveer 3 spatelpunte natriumsulfaat gedroog, waarna die ontwaterde fases versigtig onder stikstof afgedamp is. Die resulterende droë materiaal is in 500 μl water opgelos. Hierdie oplossing, asook die waterige fase is volgens die prosedure in Afdeling 3.2.1 met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie vir die teenwoordigheid van die atipiese komponente geanaliseer. Die gekonsentreerdheid van die oplossings is nie in berekening gebring nie en 'n konstante volume van 10 μl is per dunlaagskeiding angewend.

Dunlaagchromatografie van die waterfase het tot die skeiding van verskeie ninhidrien positiewe komponente gelei. Geen bande, wat met die posisie van die atipiese bande ooreenstem, was op die dunlaagchromatogram van die waterfase sigbaar nie. 'n Ligte ninhidrien positiewe band was egter op die dunlaagskeiding van die organiese suurfraksie teenwoordig. Hierdie band het aan die bokant van die chromatogram voorgekom en sy posisie het met dié van die atipiese bande ooreengestem.

Na verwagting behoort aminosure en komponente waarvan die fisies-chemiese gedrag met dié van aminosure ooreenstem in die waterfase teenwoordig te wees. Uit hierdie resultaat blyk dit dat die oplosbaarheidseienskappe van die komponent(e) in die atipiese bande nie met dié van bekende aminosure ooreenstem nie. Aangesien die onbekende komponent(e) nie saam met die aminosure geëkstraheer het nie, versterk dit die argument dat die fisies-chemiese eienskappe van die komponent(e) in die atipiese bande met dié van aminosure verskil.

4.5 ISOLERING VAN DUNLAAGPOEIER WAT DIE ONBEKENDE KOMPONENT(E) BEVAT

Die komponent(e) in die atipiese bande kon nie met behulp van Dowex-suiwering óf oplosmiddelekstraksie saam met die aminosure geïsoleer word nie. Daar is vervolgens besluit om die dunlaagpoeier wat die onbekende komponent(e) bevat fisies te isoleer en analyses daarop uit te voer.

Volgens die kreatinienwaarde is 'n vasgestelde volume uriene by die oorsprong in elk van die bane op dunlaagplate aangebring en volgens die prosedure in Afdeling 3.2.1 gechromatografeer. Slegs die linkerkantste baan is gekleur om die posisie van die atipiese bande vas te stel, waarna die ooreenstemmende dunlaagpoeier met behulp van 'n voorwerpglasie afgekrap is. Sowat 30 mg dunlaagpoeier is uit elk van die dunlaagplate geïsoleer. Ongeveer 60 mg geïsoleerde dunlaagpoeier is in elk van vier buise geplaas. 'n Volume van 600 μl water, waarvan die pH onderskeidelik 3.5 (suur), 7.0 (neutraal) en 8.0 (alkalies) was, is as oplosmiddel vir drie van die buise gebruik. Dieselfde hoeveelheid metanol is as oplosmiddel in die vierde buis gebruik. Die buise is goed geskud, waarna die poeier vir 15 minute by 11 000 opm afgeswaai is. Elk van die supernatante is deur 'n 0.2 μm Microgon-filter filtreer en na vriesdroging is 20 μl BSTFA en 4 μl TMCS by die droë materiaal gevoeg. Die monsters is vir 60 minute in 'n oond by 70°C gederivatiseer, waarna dit met behulp van GC-MS geanaliseer is. Die komponente in elk van die monsters is op 'n Hewlett-Packard 5890 series II-gaschromatograaf geskei. 'n Permabond-kolom, waarvan die lengte 25m en die interne deursnee 0.32 mm was, is deurgaans gebruik. Helium het as draergas opgetree en 'n lineêre temperatuurprogram vanaf 60°C tot 280°C, teen 'n tempo van 5°C/min, is gebruik. Die gaschromatograaf was aan 'n Hewlett-Packard 5988 A-kwadropoolmassaspektrometer gekoppel en aftasting is vanaf 70 tot 550 massa-eenhede, met 70 eV ionisasiepotensiaal en 'n brontemperatuur van 200°C, gedoen. Aangesien die komponent(e) in die atipiese bande saam met die dunlaagpoeier geïsoleer is, was dit nodig om die invloed van die sellulose dunlaagpoeier te ondersoek. Dunlaagpoeier van 'n ontwikkelde dunlaagplaat, wat geen uriene bevat het en ook nie gekleur is nie, het as kontrole gedien.

Die totale ioonchromatogram van elk van die oplossings het daarop gedui dat 'n verskeidenheid komponente in die dunlaagpoeier, wat die atipiese bande bevat, teenwoordig is. Die gliserolkonsentrasie in elk van die waterige monsters was oorweldigend in vergelyking met dié van ander komponente. 'n Groter verskeidenheid komponente is in die dunlaagpoeier, wat in metanol opgelos was, aangetref. Weereens was die gliserolkonsentrasie oorweldigend. Ander verbindings soos etileenglikool, melksuur, glikoolsuur, bensoësuur en fosforsuur was in lae vlakke teenwoordig. In Figuur 4.3 word die fragmentasiepatroon van gliserol, wat in elk van die oplossings met behulp van GC-MS gevind is, getoon. GC-MS - analise van die dunlaagpoeier, wat as kontrole gedien het, het ook op die teenwoordigheid van meerdere komponente gedui. Verder is groot hoeveelhede gliserol in die kontrole dunlaagpoeier aangetref. Fisiese isolering en GC-MS - analise van die dunlaagpoeier met die atipiese bande, het nie konkrete resultate oor die aard en die identiteit van die komponent(e) tot gevolg gehad nie.

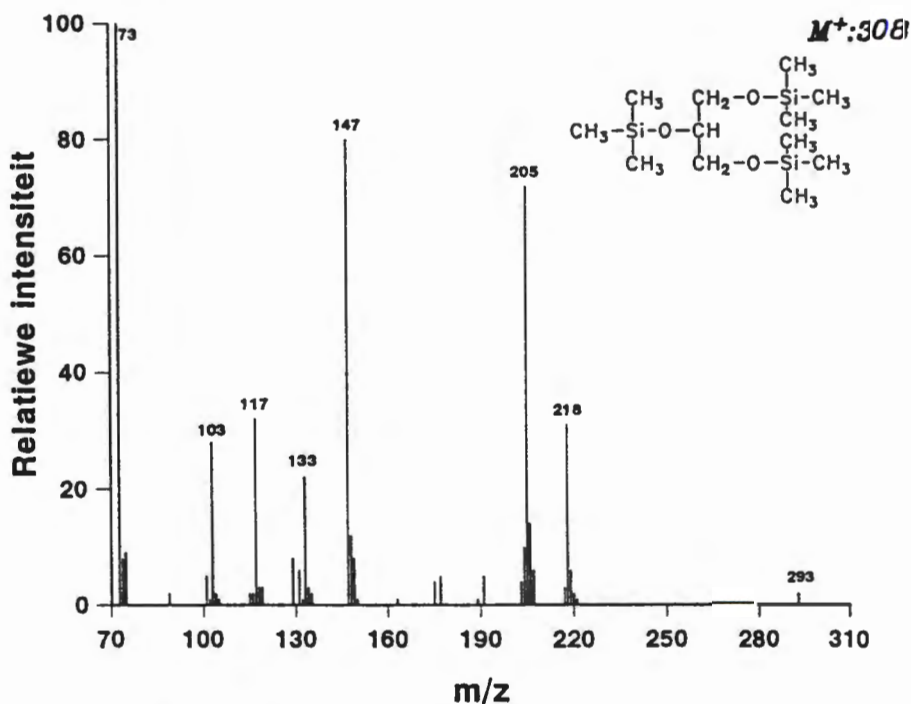


Fig. 4.3 Fragmentasie patroon van gliserol verkry met behulp van GC-MS-analise van geïsoleerde dunlaagpoeier. Die gliserolmolekule silaneer op elk van die drie hidroksiegroepe om 'n molekulêre ioon met 'n massa van 308 te lewer. Die molekulêre ioon word nie op hierdie spektrum getoon nie, maar wel die M^{15} -brokstuk met 'n massa van 293 eenhede.

4.6 KONJUGAATMETABOLIE AS MOONTLIKE OORSAAK VAN DIE ATIEPIESE BANDE

'n Besending monsters vanaf die H.F. Verwoerd neonatale eenheid is volgens die siftingsprotokol met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie geanaliseer. Die chromatografiese prosedure, soos uiteengesit in Afdeling 3.2.1, is gevolg. Verskeie urienmonsters in die besending het atipiese ninhidrien positiewe bande na eendimensionele dunlaagchromatografie getoon. Kwantitatiewe aminosuuranalise het op die teenwoordigheid van ongewone pieke op die aminosuurprofiel van hierdie urienmonsters gedui. Behalwe vir hierdie ongewone pieke, wat soortgelyk was aan dié in Figuur 4.2, was die konsentrasies van bekende aminosure binne normale grense. Aangesien geen inligting ten opsigte van die struktuur van die komponente in die ongewone pieke met behulp van kwantitatiewe aminosuuranalise verkry kan word nie, moes 'n alternatiewe metode gebruik word.

GC-MS is 'n kragtige analitiese tegniek wat aangewend kan word vir die struktuuropklaring en dus identifisering van onbekende verbindings. Die ekstraheerbare organiese inhoud van die uriene is met behulp van organiese oplosmiddele ekstraksie geëkstraheer. Die metode, soos uiteengesit in Afdeling 4.4, is gevolg - na droging is die resulterende droë materiaal nie in water opgelos nie, maar met vasgestelde volumes BSTFA en TMCS vir 40 minute in 'n oond by 70°C gederivatiser. Die volumes derivatiseringsreagens is soos volg bereken :

$$\text{Volume BSTFA } (\mu\text{l}) = 2 \times \text{kreatinienwaarde (mg\%)}$$

$$\text{Volume TMCS } (\mu\text{l}) = 0.4 \times \text{kreatinienwaarde (mg\%)}$$

'n Hoeveelheid van 2 μl van die gederivatiseerde materiaal is met behulp van GC-MS geanaliseer. Die opstelling van die apparaat was identies soos in Afdeling 4.5 en dieselfde analitiese program is gevolg.

Die totale ioonchromatogram het op die teenwoordigheid van 'n onbekende piek met 'n retensietyd van ongeveer 16 minute gedui. Uit die fragmentasiepatroon van hierdie onbekende piek is die volgende inligting verkry :

- i) Dit verteenwoordig 'n komponent waarvan die massa moontlik 231 is.

ii) Die M^{-15} het 'n massa/ladingverhouding van 216.

iii) Dit bevat 'n baie intense fragment waarvan die m/z-verhouding 172 is.

Hierdie fragmentasiepatroon word in Figuur 4.4 getoon. Die onewe massa van 231 het op die teenwoordigheid van 'n stikstof in die struktuur gedui. Sulke verbindings waarvan die massa onewe is en moontlik 'n stikstof bevat, is tipies van aminosuurkonjugate wat by sekere siektetoestande soos propioonsuururie en ander organiese suururieë voorkom. Die fragmentasiepatroon van hierdie onbekende komponent is teenoor 'n bestaande biblioteek gepas en 'n groot mate van ooreenstemming is met die elektronimpaktspektrum van isovaleriaanglisien verkry. Alhoewel isovaleriaanglisien se fragmentasiepatroon, wat in Figuur 4.5 getoon word, nie presies met dié van die onbekende verbinding ooreenstem nie, het dit ook 'n massa van 231, 'n M^{-15} van 216 en 'n intense 172-fragment. Dit is egter onwaarskynlik dat isovaleriaanglisien of 'n soortgelyke aminosuurkonjugaat die oorsaak van die atipiese bande op die dunlaagchromatogramme kan wees, aangesien hierdie konjugaatmetaboliete nie met ninhidrien kleur nie.

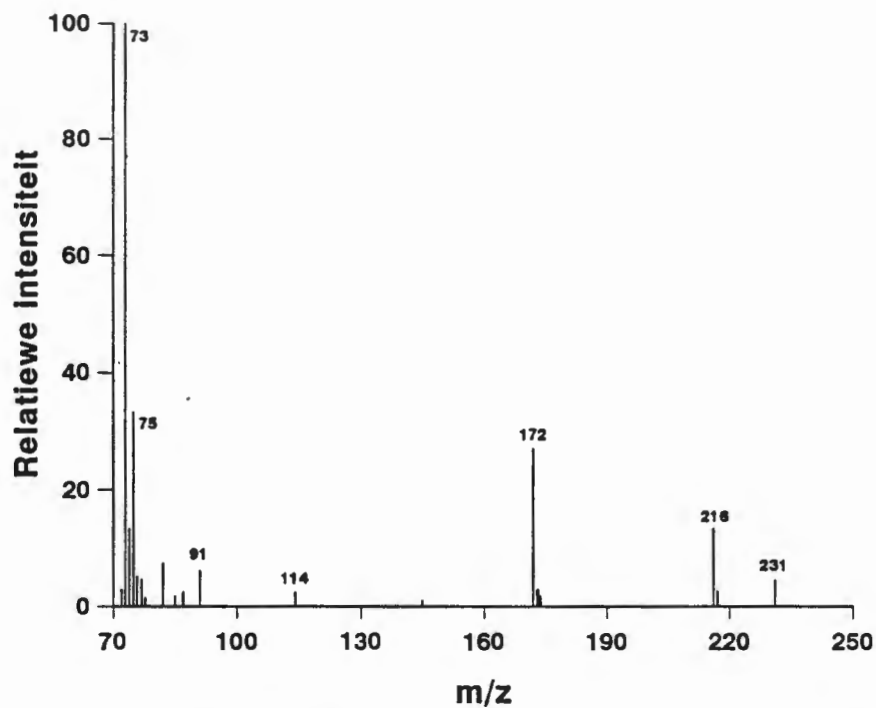


Fig. 4.4 Fragmentasiepatroon van 'n onbekende verbinding in die uriene van 'n neonatale pasiënt.

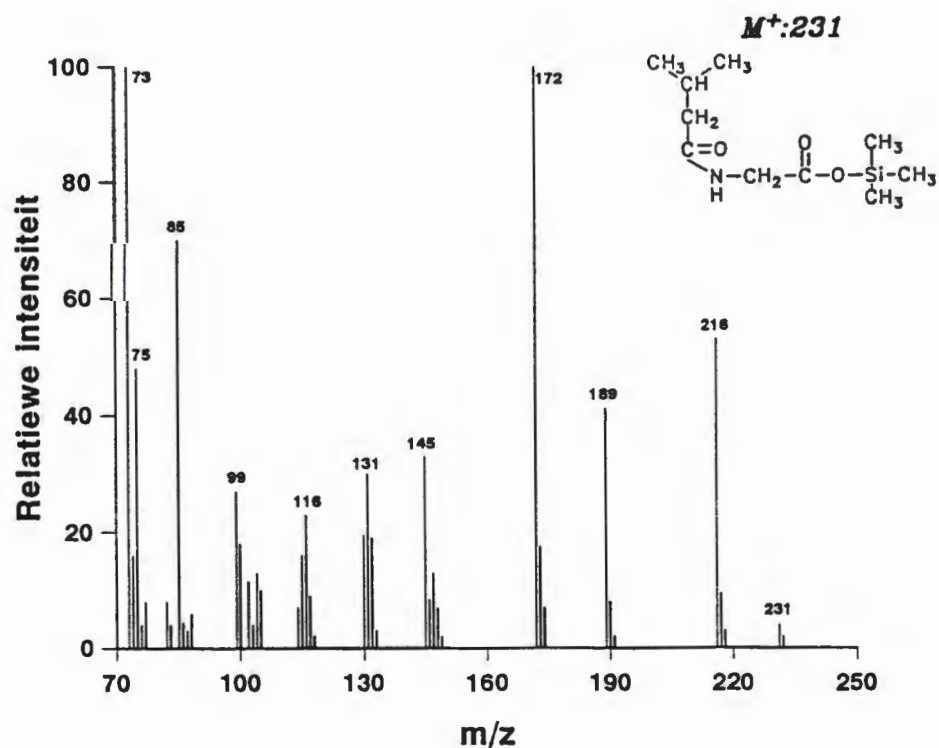


Fig. 4.5 Massaspektrum van 'n monogesilaneerde isovaleriaanglisienmolekule.

4.7 MEDIKASIE AS OORSAAK VAN DIE ATIEPIESE BANDE

Soos reeds genoem, was die monsters wat in Afdeling 4.6 getoets is, deur die neonatale eenheid van die H.F. Verwoerd Hospitaal vir analyses verwys. Hierdie spesifieke urienmonsters was almal afkomstig van pasgebore babas wat antibiotika ontvang het. In Figuur 4.6, bane 1 - 3 word die urinêre skeidingspatrone van drie van hierdie pasgebore pasiënte in vergelyking met die aminosuurstandaard (baan 4) en 'n urienmonster van 'n normale individu (baan 7) getoon.

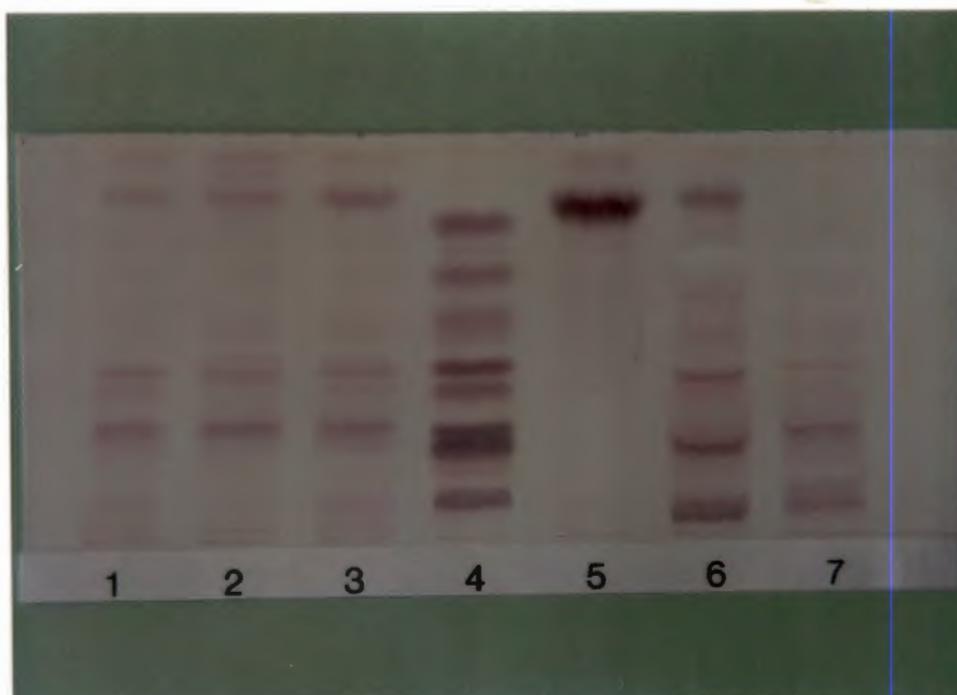


Fig. 4.6 Dunlaagchromatogramme van pasiënte op antibiotikabehandeling in vergelyking met 'n proefpersoon na die toediening van antibiotika.

Baan 1-3: Uriene van pasiënte wat ampisillien ontvang het.

Baan 4 : Aminosuurstandaard.

Baan 5 : Ampisillienoplossing van 2.5 mg/ml.

Baan 6 : Uriene van proefpersoon na toediening van ampisillien.

Baan 7 : Normale urienmonster.

By elk van die pasiëntmonsters is die atipiese bande aan die bokant van die dunlaag duidelik sigbaar. Baan 5 toon die skeidingspatroon van 'n 2.5 mg/ml

ampisillienoplossing en baan 6 toon die urinêre skeidingspatroon van 'n normale individu na toediening van 500 mg ampisillien. Behalwe vir die atipiese bande aan die bokant van die chromatogramme het die urinêre skeidingspatrone van die pasgebore pasiënte normaal voorgekom. Verder het die posisie van die atipiese bande ooreengestem met die posisie van die ninhidrien positiewe bande wat verkry is na dunlaagskeiding van 'n ampisillienoplossing. Laastens was die urinêre skeidingspatroon van 'n normale individu na toediening van ampisillien soortgelyk aan dié van die pasgebore pasiënte wat antibiotika ontvang het. Uit hierdie resultaat blyk dit dat medikasie, en meer spesifiek antibiotika, 'n effek kan hê op die ontstaan van atipiese ninhidrien positiewe bande op die dunlaagskeidings van sommige urienmonsters.

4.7.1 Eendimensionele dunlaagchromatografie van 'n aantal antibiotikas

'n Verskeidenheid antibiotikas wat in die laboratorium gebruik word, asook sommige kommersieel beskikbare antibiotikas is met behulp van dunlaagchromatografie nagegaan. Die volgende antibiotikas is gebruik : amoksisillien, ampisillien, chloramfenikol, kloksasillien, natruimbensielpenisilline en tetrasiklien. 'n Hoeveelheid van 2.5 mg van die onderskeie antibiotikas is in 1 ml water opgelos en goed geskud. Nadat die antibiotikapoeier heeltemal opgelos het, is 5 μ l van elk van die oplossings op dunlaagplate aangebring en volgens die prosedure in Afdeling 3.2.1 gechromatografeer en gekleur.

Figuur 4.7 toon die skeidingspatrone van die antibiotika-oplossings in vergelyking met die aminosuurstandaard. In baan 1 is 'n enkele ninhidrien positiewe band op die dunlaagskeidingspatroon van die amoksisillienoplossing sigbaar. Die loopfront van hierdie band is effens hoër as dié van die aminosure in die standaardmengsel (baan 4). Baan 2 toon die dunlaagskeidingspatroon van die ampisillienoplossing. In hierdie geval is daar twee bande, waarvan die onderste band duideliker as die boonste is, aan die bokant van die chromatogram teenwoordig. Die posisie van hierdie bande stem baie goed ooreen met dié van die atipiese bande wat by sommige pasiënt

urienmonsters waargeneem is (kyk Figuur 4.6, bane 1 - 3). Op die dunlaagskeidingspatrone van die natriumbensielpenisillineoplossing (baan 6) is dun bande wat met ninhidrien gekleur het sigbaar. Hierdie bande is egter teenaan die loopfront van die loopmiddel geleë en hul posisies stem nie met dié van die atipiese bande ooreen nie. Die chloramfenikoloplossing (baan 5) het geen ninhidrien positiewe bande na dunlaagchromatografie getoon nie en slegs 'n liggeel band is op die dunlaagskeiding van die tetrasiklienoplossing (baan 7) waargeneem.

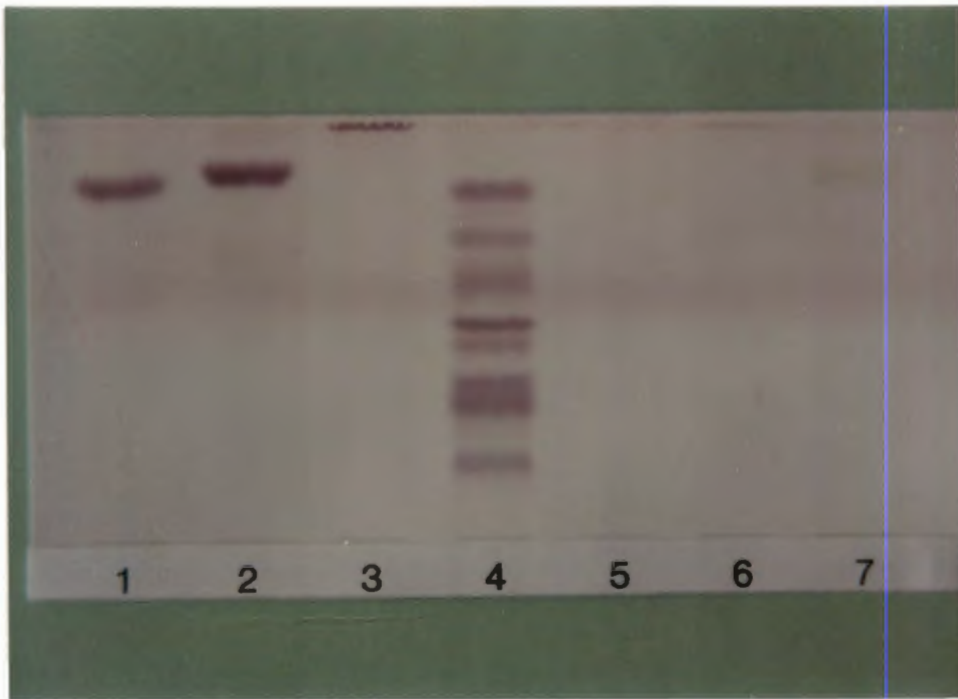


Fig. 4.7 Skeidingspatrone van verskillende antibiotika-oplossings na eendimensionele dunlaagchromatografie.

- Baan 1: Amoksisillien
- Baan 2: Ampisillien
- Baan 3: Natriumbensielpenisilline
- Baan 4: Aminosuurstandaard
- Baan 5: Chloramfenikol
- Baan 6: Kloksasillien
- Baan 7: Tetrasiklien

Die chemiese strukture van die antibiotikas wat getoets is, word in Figuur 4.8 getoon. Deur die chemiese struktuur van amoksisillien en ampicillien met die algemene struktuur van die aminosure te vergelyk, lyk die strukture op die oog af heeltemal verskillend. Beide hierdie penisilline besit egter, soos die meerderheid aminosure, 'n vrye primêre amiengroep. Die chemiese struktuur van amoksisillien en ampicillien is dus van sodanige aard dat hulle met ninhidrien kan reageer om 'n pers pigment te vorm (vergelyk Figuur 4.1). Weens sy chemiese struktuur leen chloramfenikol hom nie tot ninhidrienkleuring nie. Alhoewel tetrasiklien 'n primêre amiengroep besit, sal dit heel moontlik nie 'n pers pigment met ninhidrien vorm nie, aangesien die stikstof van die amiengroep deel van 'n sterk peptiedbinding uitmaak. Hierdie peptiedband word in Figuur 4.8 aangedui. Die liggeel band wat op die dunlaagskeiding van die tetrasiklienoplossing voorkom, kan moontlik die gevolg van die reaksie tussen ninhidrien en die tersiêre amiengroep in die tetrasiklienmolekule wees. Daar kan egter nie 'n verklaring vir die kleuring van die ander penisilline, kloksasillien en natriumbensielpenisilline gebied word nie.

Van die ses antibiotikas wat getoets is, het die vier penisillinemonsters pers gekleur na ninhidrienkleuring, tetrasiklien het liggeel gekleur en chloramfenikol het glad nie gekleur nie. Aangesien amoksisillien en ampicillien wel met ninhidrien gekleur het en die posisies van hul ninhidrien positiewe bande met dié van die atipiese bande ooreenstem, is dit duidelik dat hierdie antibiotikas 'n effek kan hê op die ontstaan van atipiese ninhidrien positiewe komponente in urienmonsters afkomstig van pasiënte op antibiotikabehandeling.

4.7.2 GC-MS - analise van 'n aantal antibiotikas

Daar is besluit om die verskillende antibiotikas wat in Afdeling 4.7.1 getoets is, verder met behulp van GC-MS te analiseer. 'n Spatelpunt van elk van die antibiotikas is in afsonderlike buise geplaas. By elk van die buise is 'n hoeveelheid van 100 μl BSTFA en 20 μl TMCS gevoeg, waarna die mengsels vir 60 minute in 'n oond by 70°C verhit is. 'n Konstante hoeveelheid van 2 μl van die gederivatiseerde materiaal

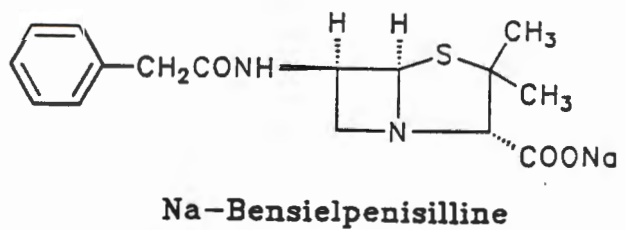
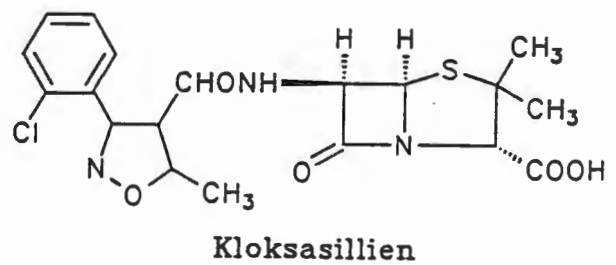
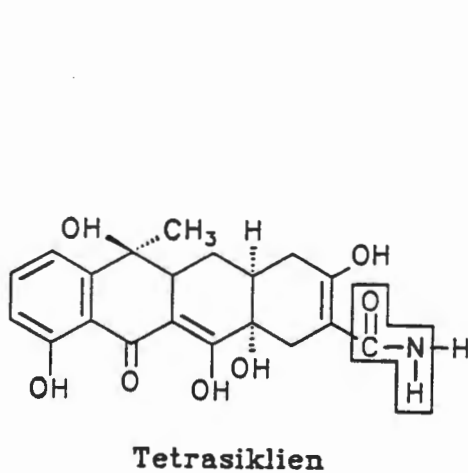
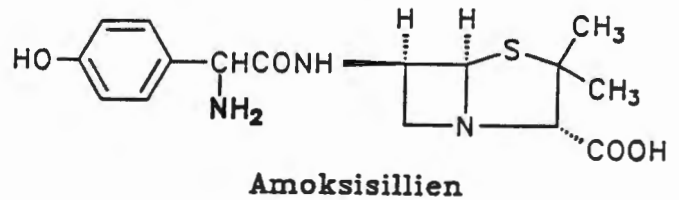
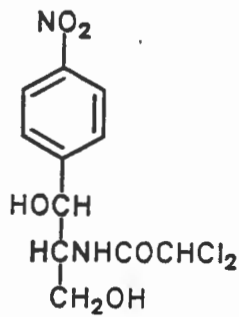
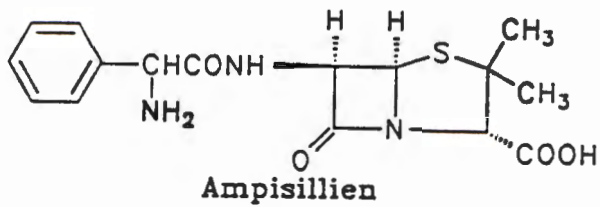


Fig. 4.8 Chemiese strukture van die verskillende antibiotikas wat getoets is. Die peptiedband wat deel van die tetrasiklienmolekule uitmaak, word ook aangedui.

is met behulp van GC-MS geanaliseer. Die opstelling van die apparaat was identies soos in Afdeling 4.5 en dieselfde analitiese program is gevolg.

Die totale ioonchromatogram van elk van die vier penisillinemonsters het 'n relatiewe sterk piek in die omgewing van 16 minute getoon, wat nie op die totale ioonchromatogram van tetrasiklien of chloramfenikol teenwoordig was nie. Die fragmentasiepatroon van die piek wat op elk van die penisilline se chromatogramme teenwoordig was word in Figuur 4.9 getoon. Hierdie fragmentasiepatroon verteenwoordig 'n komponent waarvan die molekulêre ioon 'n massa van 231 na silanering het. Op grond van die inligting wat uit die fragmentasiepatroon verkry is, is die struktuur van die komponent opgeklaar. Die spesifieke komponent is moontlik afkomstig van 'n gedeelte van die penisillinemolekule.

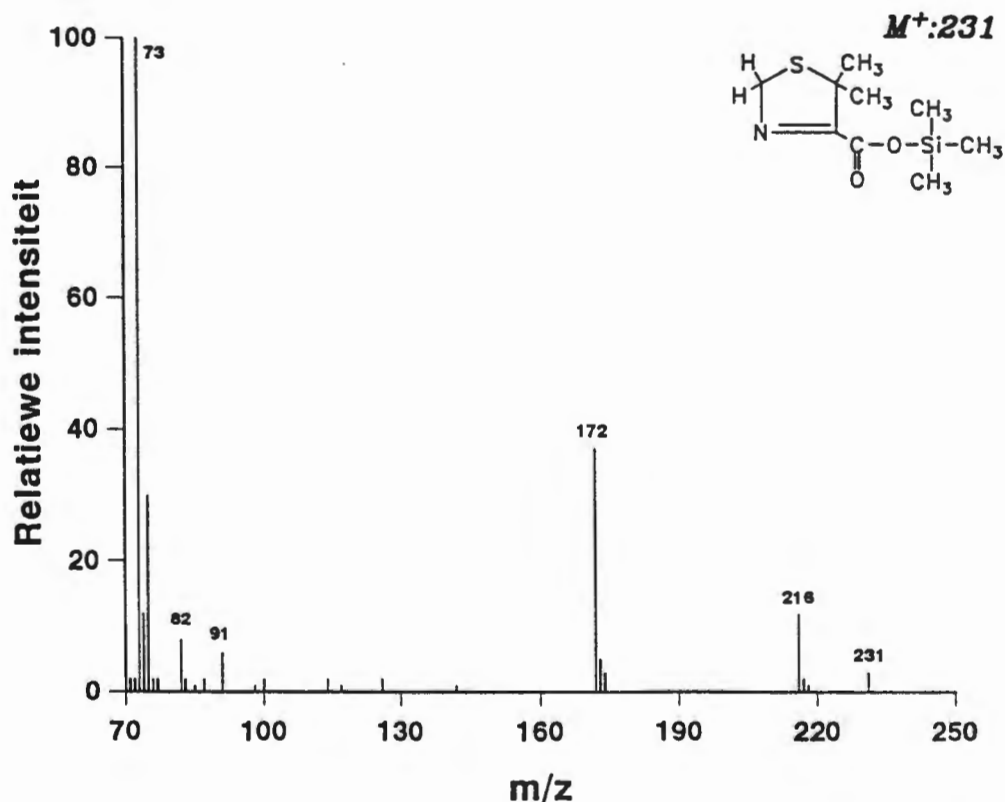


Fig. 4.9 Fragmentasiepatroon van 'n komponent wat in penisilline voorkom.

Penisilline kan deur die algemene struktuur wat in Figuur 4.10 getoon word, voorgestel word. Die penisillinemolekule bevat twee ringstrukture wat onderskeidelik as die tiasolidienring en die asetidinoonring bekend staan. Die vyfledige tiasolidienring het 'n molekulêre massa van 159.

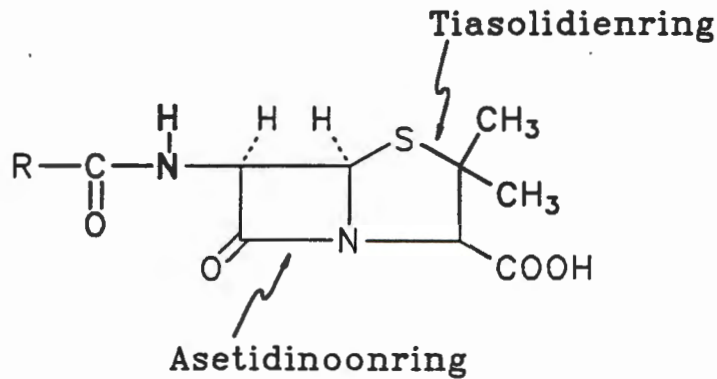


Fig. 4.10 Algemene struktuur van die penisilline.

Na silanering en ionisasie het hierdie gedeelte van die penisillinemolekule 'n massa/ladingverhouding van 231 (kyk Figuur 4.11). Hierdie komponent waarvan die gesilaneerde massa 231 is, was in elk van die vier penisillinemonsters wat getoets is teenwoordig, maar kom nie in tetrasiklien of chloramfenikol voor nie.

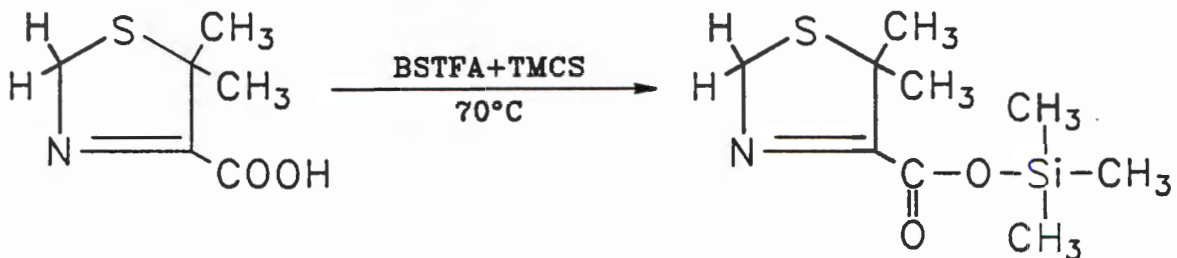


Fig. 4.11 Struktuur en molekulêre massa van die tiasolidienring voor en na silanering.

4.7.3 Ampisillienbelading op 'n proefpersoon

Direkte derivatisering van 'n aantal antibiotikas het daarop gedui dat 'n gedeelte van die penisillinemolekule, as die silaanderivaat, met behulp van GC-MS opgespoor kan word. Die penisilline, ampisillien, is aan 'n gesonde proefpersoon toegedien en uriene is met GC-MS nagegaan vir die teenwoordigheid van komponente afkomstig van die antibiotika.

Na 'n oornagvas is 'n urienmonster van 'n gesonde individu geneem, waarna 'n hoeveelheid van 250 mg kommersieel beskikbare ampisillien oraal toegedien is. Urienmonsters is oor 'n tydperk van 24 uur na toediening versamel. Ses urienmonsters wat oor die tydperk versamel is, asook die urienmonster wat na die oornagvas geneem is, is met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie vir die teenwoordigheid van atipiese bande nagegaan. Die prosedure soos uiteengesit in Afdeling 3.2.1, is gevolg. Die ontwikkelde dunlaagplaat het getoon dat slegs een urienmonster wat 2½ uur na toediening van ampisillien versamel is 'n atipiese ninhidrien positiewe band bevat het. Die organiese inhoud van hierdie urienmonster is volgens die metode in Afdeling 4.4 geëkstraheer. Na ontwatering en afdamping onder stikstof is die gedroogte organiese materiaal met vasgestelde volumes BSTFA en TMCS vir 40 minute in 'n oond by 70°C gederivatieer. Die volumes derivatiseringsreagens is met behulp van die formules in Afdeling 4.6 bereken. 'n Hoeveelheid van 2µl van die gederivatieerde materiaal is met behulp van GC-MS geanaliseer. Die opstelling van die apparaat was identies soos in Afdeling 4.5 en dieselfde analitiese program is gevolg.

GC-MS - analise van die uriene van die proefpersoon na toediening van ampisillien het op die teenwoordigheid van 'n verskeidenheid komponente gedui. 'n Komponent wat vroeër in elk van die vier penisillinemonsters wat getoets is aangetref is, is ook in die proefpersoon se uriene opgespoor. Hierdie komponent was nie in 'n vastende urienmonster van die proefpersoon teenwoordig nie. Die komponent, waarvan die gesilaneerde massa 231 is, se fragmentasiepatroon stem presies ooreen met dié van 'n komponent wat in groot hoeveelhede in penisilline voorkom (Figuur 4.12)

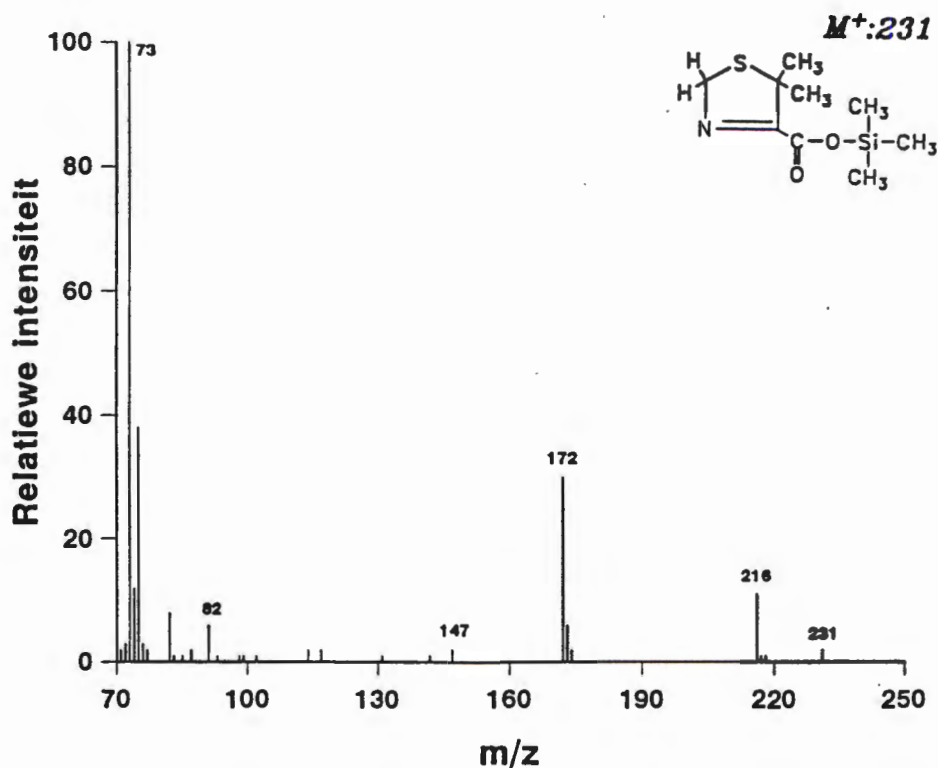


Fig. 4.12 Massaspektrum van 'n komponent in die uriene van 'n proefpersoon na toediening van die penisillien, ampisillien.

Die urienmonster wat na die oornagvas, maar voor ampisillientoediening geneem is, het geen atipiese ninhidrien positiewe bande na dunlaagchromatografie en kleuring getoon nie. In teenstelling hiermee was 'n duidelike ninhidrien positiewe band aan die bokant van die dunlaagskeiding van die urienmonster wat $2\frac{1}{2}$ uur na ampisillientoediening geneem is sigbaar. GC-MS - analise van laasgenoemde urienmonster het die teenwoordigheid van 'n komponent, waarvan die gesilaneerde massa 231 is, getoon. Geen ooreenstemmende komponent is egter in die vastende urienmonster aangetref nie. Uit hierdie resultaat kan daar met sekerheid gesê word dat sommige penisilline verantwoordelik is vir die ontstaan van ninhidrien positiewe bande op dunlaagchromatogramme. Hierdie resultaat is met GC-MS bevestig, aangesien die tiasolidiengedeelte van ampisillien nie in die vastende urienmonster van 'n gesonde proefpersoon gevind kon word nie, maar wel in dieselfde proefpersoon se uriene na toediening van ampisillien.

4.8 SAMEVATTING

Gedurende die tydperk waarin fisiologiese monsters vir defekte van die aminosuurmetabolisme nagegaan is, is ongewone bande op die dunlaagchromatogramme van sommige urienmonsters aangetref. 'n Totaal van 12.6 % van alle urienmonsters wat geanaliseer is, het atipiese ninhidrien positiewe bande getoon wat nie met 'n bekende aminosuurdefekte in verband gebring kon word nie. Die urienmonsters kon nie as normaal geklassifiseer word nie, aangesien hulle addisionele ninhidrien positiewe bande bevat het. Aminosuurprofile van hierdie urienmonsters, wat met behulp van outomatiese aminosuuranalise verkry is, het op die teenwoordigheid van pieke met ongewone vorms gedui.

Aangesien die ongewone komponente wat in die uriene teenwoordig was met ninhidrien gekleur het, het die moontlikheid bestaan dat hulle struktureel verwant is aan aminosure. Op grond hiervan is twee tegnieke, naamlik ionuitruiling en oplosmiddelekstraksie aangewend om hierdie komponent(e) saam met die aminosure te isoleer. Nie een van hierdie tegnieke kon egter daarin slaag om die komponent(e), wat vir die atipiese bande verantwoordelik was, saam met die aminosure te isoleer nie en gevolglik was dit duidelik dat hul fisies-chemiese eienskappe met dié van aminosure verskil.

Alhoewel bogenoemde tegnieke 'n aanduiding van die aard van die ongewone komponent(e) gegee het, kon dit geen strukturele inligting verskaf nie. GC-MS -analise van 'n urienmonster wat atipiese bande na dunlaagskeiding getoon het, het op die teenwoordigheid van 'n komponent waarvan die gesilaneerde massa 231 was gedui. Die fragmentasiepatroon van hierdie komponent wat nie in normale urienmonsters aangetref is nie, het 'n groot mate van ooreenstemming met aminosuurkonjugate getoon. Die moontlikheid dat 'n aminosuurkonjugaat vir die ontstaan van atipiese bande verantwoordelik was, is egter onwaarskynlik aangesien hierdie konjugaatmetaboliete nie met ninhidrien kleur nie.

'n Besending urienmonsters afkomstig van pasgebore babas op medikasie het die

aandag op antibiotika as moontlike oorsaak van die atipiese bande gevestig. Dunlaagskeiding van verskeie antibiotikas het daarop gedui dat sommige penisilline ninhidrien positiewe bande, waarvan die posisie met dié van die atipiese bande ooreenstem, tot gevolg het. Verder het GC-MS - analise getoon dat elk van die penisilline wat getoets is 'n komponent van 231 massa-eenhede bevat wat vroeër in pasiënturiene opgespoor is.

'n Ampisillienbelading op 'n proefpersoon het bevestig dat penisilline wel 'n effek op die ontstaan van atipiese ninhidrien positiewe komponente kan hê, aangesien uriene afkomstig van hierdie proefpersoon 'n atipiese ninhidrien positiewe band na dunlaagchromatografie getoon het en GC-MS - analise ook op die teenwoordigheid van 'n komponent met 'n massa/ladingverhouding van 231 gedui het.

Die resultate wat met hierdie ondersoek verkry is, het 'n gedeelte van die penisillinemolekule, wat as die **tiasolidienring** bekend staan, as moontlike oorsaak vir die ontstaan van die atipiese ninhidrien positiewe bande op dunlaagchromatogramme uitgewys.

HOOFSTUK 5

'n SWART FAMILIE MET HIPERFENIELALANIENEMIE

5.1 INLEIDING

Tydens die twee jaar lange studie van defekte van die aminosuurmetsbolisme is 'n uitsonderlike geval van hiperfenielalanienemie opgespoor. Die aanvanklike tweeledige benadering van eendimensionele dunlaagchromatografie en kwantifisering met behulp van outomatiese aminosuuranalise, soos uiteengesit in Hoofstuk 3, het tentatief op 'n variante vorm van HPA gedui. Aangesien die variante vorms van HPA slegs een tot twee persent van alle HPA-gevalle uitmaak (Scriver *et al.*, 1989; Dhondt, 1984; Niederwieser *et al.*, 1985), was dit duidelik dat 'n baie seldsame siektetoestand opgespoor is. Wat die betrokke geval nog meer uitsonderlik gemaak het, was die ras van die pasiënt - dit was 'n swart babadogtertjie. In 'n omvattende artikel noem Scriver en medewerkers (1989) dat daar tradisioneel na defekte van die fenielalanienemetsbolisme as "Kaukasiese siektetoestande" verwys word. Hierdie stelling blyk baie waar te wees, aangesien die geval wat in hierdie hoofstuk bespreek word die eerste bekende geval van HPA onder die swart populasie in Suid - Afrika is.

'n Benaderingswyse is geformuleer waarvolgens die aard van hiperfenielalanienemie by die betrokke pasiënt en haar gesin vasgestel kon word. Hierdie benaderingswyse is gekies aangesien dit, soos uit die literatuur in Afdelings 2.3 en 2.4 behoort te volg, verskillende aspekte van moontlike defekte in die katabolisme van fenielalanien ondersoek. Die betrokke ensimetiese sisteem is baie kompleks en 'n defek in enige komponent van die sisteem kan tot HPA lei. Die gekose benaderingswyse gee 'n aanduiding van die algehele status van metaboliëte wat normaalweg, asook onder patologiese toestande in die sisteem teenwoordig is (kyk Figuur 2.5). Figuur 5.1 gee 'n skematiese voorstelling van die benadering wat gevolg is vir die differensiële

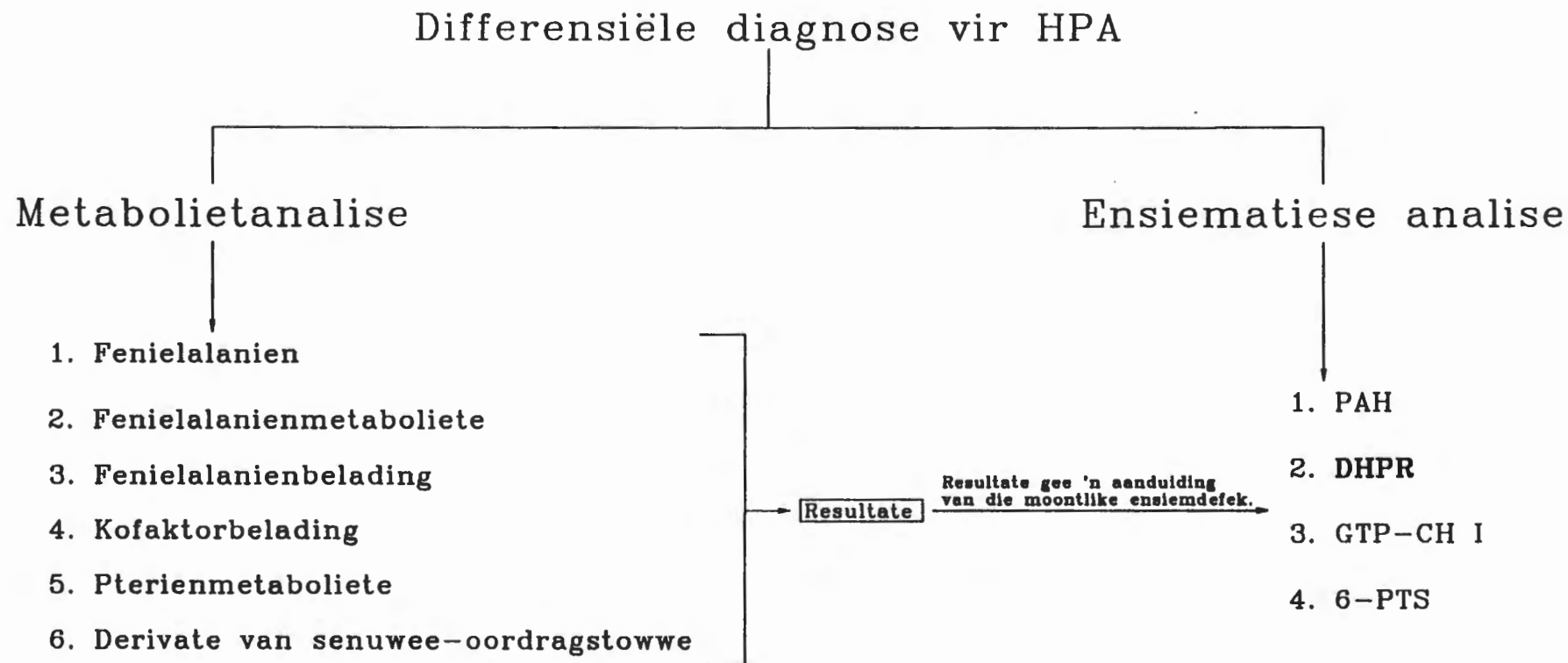


Fig. 5.1 Skematiese voorstelling van die benaderingswyse wat gevolg is om die presiese aard van hiperfeniëalanienemie by pasiënt L vas te stel.

diagnose van HPA. Die metabolietanalises wat op die figuur aangedui word, gee 'n aanduiding van die moontlike ensiemdefek. Die betrokke defek kan dan met ensiematiese analise bevestig word.

Die doelstellings van hierdie studie was :

- i) Om die pasiënt se kliniese toestand en biochemiese beeld wat met die aanvanklike siftingsprosedures verkry is te evalueer
- ii) Om 'n benaderingswyse wat progressief meer inligting rondom die status van metaboliete in die pasiënt se PAH-sisteem inwin te formuleer.
- iii) Om van gevorderde tegnieke gebruik te maak ten einde vir hierdie metaboliete te analiseer.
- iv) Om op grond van metabolietanalises 'n voorlopige diagnose te maak.
- v) Om die voorlopige diagnose deur ensiematiese analise te bevestig.

5.2 FAMILIEGESKIEDENIS EN KLINIESE BEELD

Pasiënt L is die derde kind van gesonde nie-verwante ouers (kyk Figuur 5.2 vir familie stamboom). Sy is op 6 Junie 1989 as een van 'n tweeling gebore - die ander baba is manlik. Die moeder was gesond tydens die swangerskap en het op voltyd spontaan in kraam gegaan. In die neonatale tydperk was pasiënt L meer huilerig as haar tweelingbroer en sy het met 'n chroniese toeneus gesukkel. Sy het voedingsprobleme ondervind en onbevredigende massatoename getoon. Die pasiënt het op die ouderdom van 5 maande by die Kalafong hospitaal presenteer met die simptome van 'n stuipe-aanval. Volgens die geneesheer was die pasiënt se voorkoms op daardie stadium effens dismorfies. Haar wenkbroue was ruig en aaneenlopend (Eng. synophrys) en sy het 'n plat neusbrug, nou voorkop en hoë verheemelte gehad. 'n Ondersoek van die neurologiese stelsel het op ernstige abnormaliteite gëdui. Die pasiënt se kopbeheer was swak en in die maagposisie het sy nie haar kop sywaarts gedraai nie. 'n Algemene ekstensiepatroon was teenwoordig en haar handjies was geneig om in die proneerde vuisposisie te bly. Aanhoudende kwyling is ook waargeneem. Sedert die aanvanklike ondersoek het haar neurologiese toestand

sodanig progressief agteruitgegaan dat sy nog geeneen van haar mylpale van ontwikkeling bereik het nie. Sy is ondergewig, blind en het waarskynlik ook ernstige gehoorinkorting.

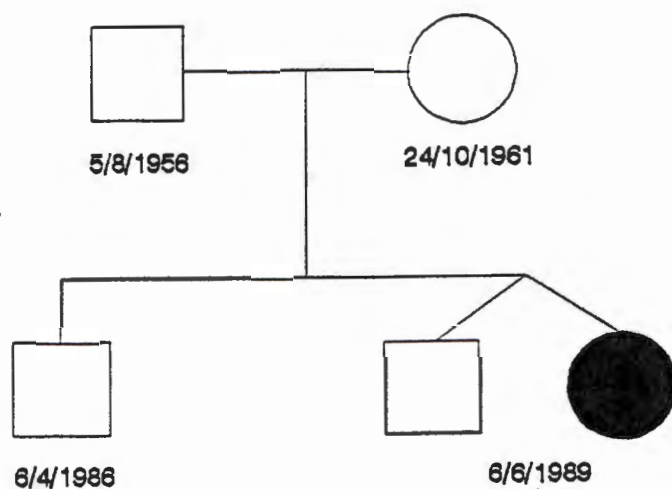


Fig. 5.2 Verkorte stamboom van die swart familie met hiperfenielalanienemie.
 □ Manlik O Vroulik ● HPA

5.3 METABOLIETANALISE

5.3.1 Feniellalanienbepalings

Met behulp van die tweeledige benadering van eendimensionele dunlaagchromatografie en kwantitatiewe aminosuuranalise is 'n plasmamonster van pasiënt L vir moontlike abnormaliteite nagegaan. Dit is die standaardbenadering wat vir die duur van die studie gevolg is om vir defekte van die aminosuurmetsbolisme te toets (kyk Hoofstuk 3). Die eksperimentele prosedures, wat in Afdeling 3.2 uiteengesit is, is noukeurig nagevolg. Chromatografiese dunlaagskeiding van aminosure in die aanvanklike plasmamonster het 'n baie intense band op die posisie waar feniellalanien voorkom getoon. Kwantitatiewe analise van die aminosuuriinhoud van hierdie plasmamonster het op verhoogde vlakke van feniellalanien gedui. Die feniellalanienkonsentrasie was 0.466 mM in teenstelling met die normaalwaardes van 0.023 - 0.069 mM vir kinders in dieselfde ouderdomsgroep (Bremer *et al.*, 1981).

In 'n opvolgmonster was die konsentrasie van fenielalanien selfs hoër op 'n vlak van 0.624 mM.

Hiperfenielalanienemie word gedefinieer as 'n plasmafenielalanienwaarde hoër as 0.12 mM (Scriver *et al.*, 1989). Die verhoogde fenielalanienvlakke in twee afsonderlike monsters van pasiënt L het dus duidelik op 'n geval van HPA gedui. Pasiënt L se fenielalanienvlakke was egter laer as die vlakke van 1.2 mM en hoër wat by pasiënte met fenielketonurie (PKU) voorkom. Aangesien die presiese aard van HPA nie slegs met die kwantifisering van die fenielalanienvlakke vasgestel kon word nie, was addisionele analyses genoodsaak.

5.3.2 Metaboliete van fenielalanien

'n Defek in die fenielalanienhidroksilasesisteem het tot gevolg dat fenielalanien nie normaalweg na tirosien omgeskakel word nie. Die geakkumuleerde fenielalanien word dan langs alternatiewe weë weggevoer. Onder kondisies waar fenielalanienvlakke verhoog is, speel die transaminasereaksie 'n belangrike rol in die katabolisme van die spesifieke aminosuur. Hierdie reaksie lei tot die ontstaan van fenoliese komponente soos onder meer fenielpiruvaat, fenielasetaat, fenielaktaat en p-hidroksiefenielasetaat (kyk Figuur 2.3). Alhoewel die teenwoordigheid van fenielpiruvaat onbetroubaar vir populasiesifting en monitering van behandeling is, is dit tog van diagnostiese waarde, aangesien teenwoordigheid van fenoliese komponente in die uriene as bevestiging vir 'n defekte PAH - sisteem mag dien.

'n Urienmonster van pasiënt L is met behulp van gaschromatografie vir die teenwoordigheid van fenoliese komponente nagegaan. Die kreatinienwaarde van die uriemonster is volgens die prosedure in Afdeling 3.2.1 bepaal. Een milliliter van die pasiënt se uriene is in 'n buis gepipetteer en met 'n 5 M soutsuuroplossing tot pH 1 aangesuur. As interne standaard is 'n 52.5 mg% (m/v) 3-fenielbottersuuroplossing gebruik. Die volume interne standaard is soos volg bereken :

$$\text{Volume interne standaard } (\mu\ell) = 5 \times \text{kreatinienwaarde (mg\%)}$$

Die ekstraheerbare organiese inhoud van die urienmonster is volgens die prosedure in Afdeling 4.4 geëkstraheer. Na ontwatering en droging is die residu met vasgestelde volumes BSTFA en TMCS (kyk Afdeling 4.6) vir 40 minute in 'n oond by 70°C gederivatiseer. 'n Hoeveelheid van 2 $\mu\ell$ van die gederivatiseerde materiaal is op 'n Carlo Erba 6000-gaschromatograaf geanaliseer. Skeiding van komponente in die monster het op 'n Permabond SE 30-DF-0.25-kolom, waarvan die lengte 25 m en die interne deursnee 0.32 mm was, plaasgevind. Stikstof, wat as draergas opgetree het, het teen 'n tempo van 1 ml per minuut deur die kolom beweeg en deteksie is met behulp van 'n vlamionisasiedetektor by 260°C gedoen. 'n Lineêre temperatuurgradiënt vanaf 70°C tot 270°C, teen 'n tempo van 5°C per minuut, is vir die skeiding van organiese komponente aangewend. Die data is met behulp van 'n Spectra-Physics-integreerder (SP 4290) verwerk. Om die konsentrasies van organiese komponente in die monster te bereken, is die volgende formule gebruik :

$$C_i = \{ \text{Area}_i / \text{Area}_{is} \} \times \{ C_{is} / [K.MM] \}$$

waar C = konsentrasie

i = organiese suur

is = interne standaard

K = kreatinienwaarde in mg%

MM = molekulêre massa van organiese suur

Die chromatografiese skeiding van organiese sure in 'n urienmonster van pasiënt L het op abnormaliteite gedui. 'n Verskeidenheid fenoliese komponente, wat met die transaminering van feniellalanien geassosieer word, is in die monster aangetref. Figuur 5.3 gee 'n grafiese voorstelling van die vlakke waarin sommige van hierdie fenoliese komponente in pasiënt L se uriene teenwoordig was. Die identiteit van enkele van die fenoliese sure wat met behulp van gaschromatografie in pasiënt L se uriene opgespoor is, is met GC-MS bevestig. 'n Hoeveelheid van 2 $\mu\ell$ van dieselfde gederivatiseerde materiaal is op 'n gaschromatograaf, wat aan 'n massaspektrometer gekoppel was, geanaliseer. Die opstelling van die apparaat was identies soos in Afdeling 4.5 en dieselfde analitiese program is gevolg. Massaspektra van die drie

fenoliese komponente wat in die hoogste konsentrasie in pasiënt L se uriene teenwoordig was, word in Figuur 5.4 getoon. Die chemiese strukture wat op die figuur aangetoon word, is met behulp van die inligting wat uit die fragmentasiepatrone verkry is, saamgestel. Hierdie strukture stem met die gesilaneerde derivate van onderskeidelik fenielpiruvaat, feniellaktaat en fenielasetaat ooreen.

By normale individue verantwoord produkte van die transaminaseweg slegs vir 'n klein fraksie van die feniellalanien wat daaglik gekataboliseer word (Scriver *et al.*, 1989). Aangesien die transaminaseweg normaalweg onbelangrik is en slegs "in werking tree" onder toestande waar die hoof katabolieseweg, via feniellalanienhidroksilase, geblokkeer is, dien bogenoemde resultaat as bevestiging dat daar wel 'n defek in pasiënt L se feniellalanienhidroksilasesisteem is.

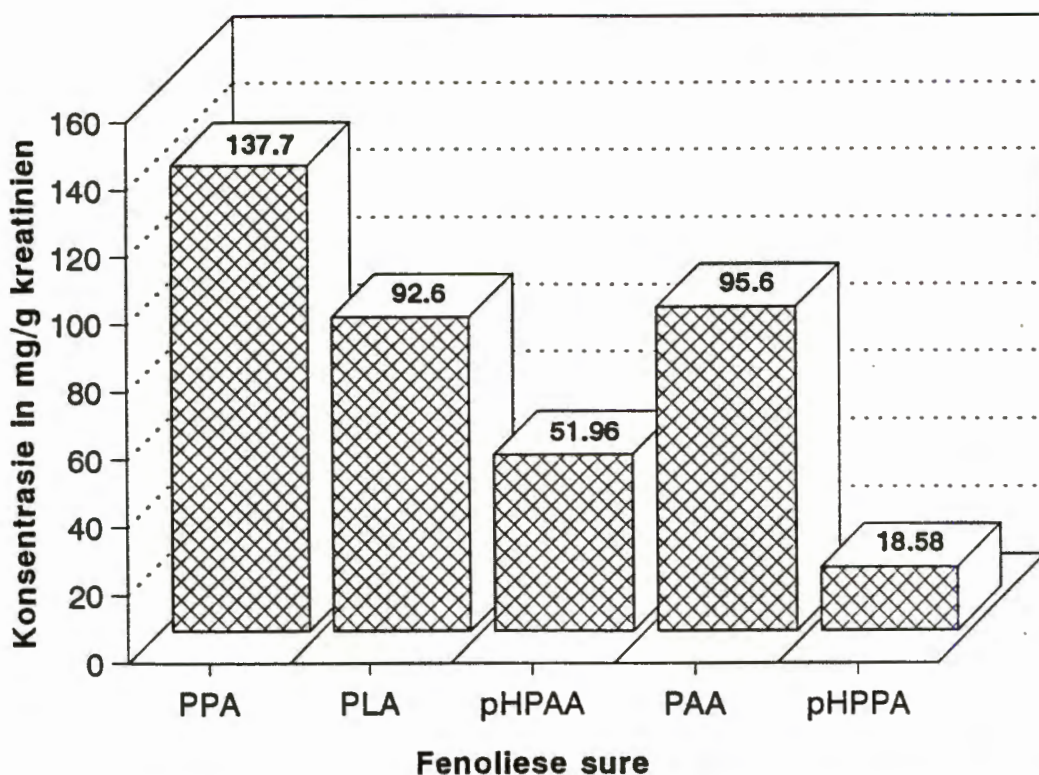


Fig. 5.3 Vlakke van fenoliese sure in 'n urienmonster van pasiënt L. PPA = fenielpiruvaat; PLA = feniellaktaat; pHPAA = ρ -OH-fenielasetaat; PAA = fenielasetaat; pHPPA = ρ -OH-fenielpiruvaat.

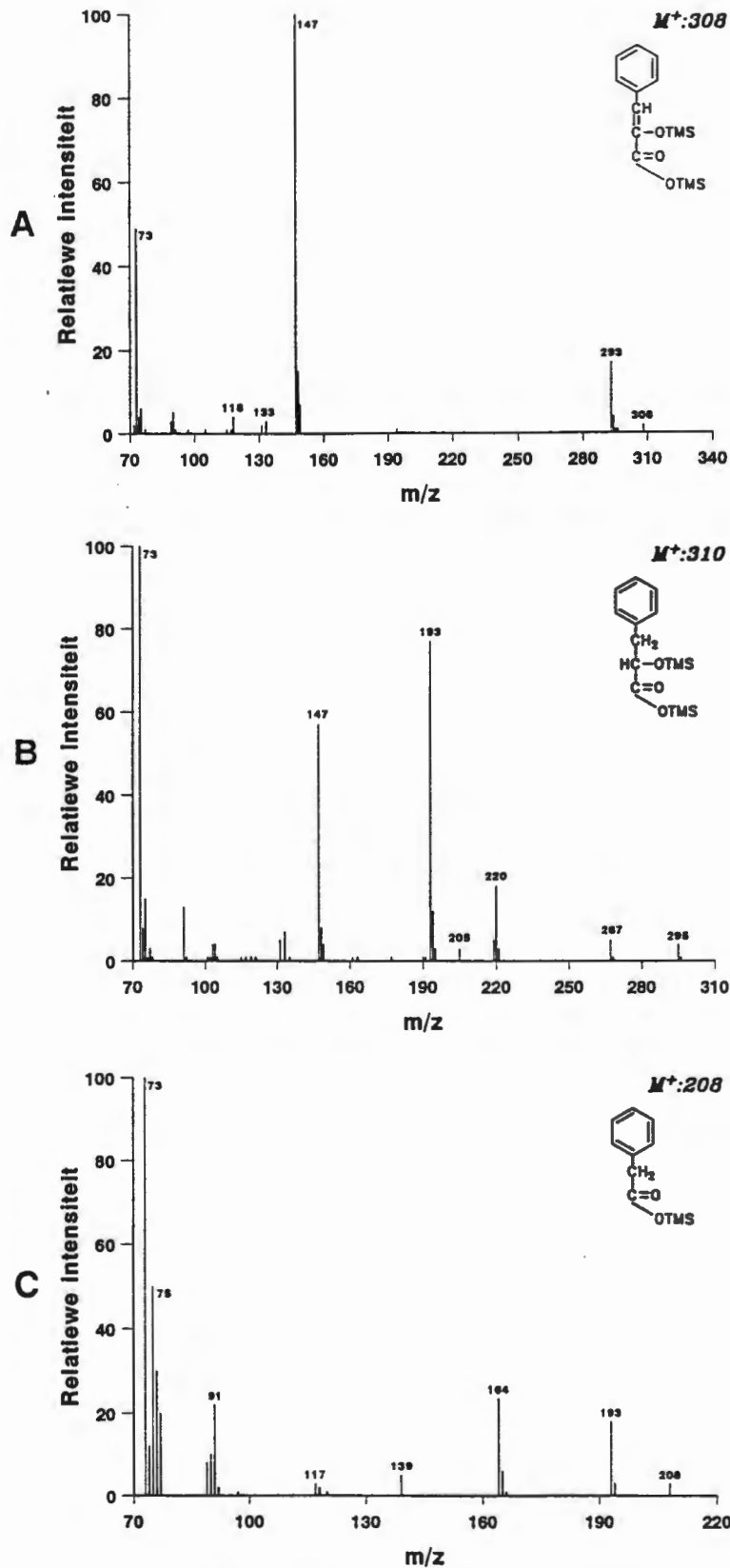


Fig. 5.4 Massaspektra van die vernaamste gesilaneerde organiese sure wat in die uriene van pasiënt L gevind is. A = fenielpiruvaat di-TMS; B = feniellaktaat di-TMS; C = fenielasetaat mono-TMS.

5.3.3 Feniellalanienbeladings

Die beginsel van 'n feniellalanienbeladingstoets is om vas te stel hoedanig die feniellalanienhidroksilasesisteem van 'n individu op 'n oormaat feniellalanien reageer. Konsentrasiebepalings van feniellalanien en tirosien in serum - of plasmamonsters gedoen dan 'n aanduiding van die tempo waarteen die betrokke individu feniellalanien na tirosien omskakel. 'n Feniellalanienbeladingstoets dien dus as 'n indirekte bepaling van feniellalanienhidroksilase-aktiwiteit. Verskillende benaderings tot feniellalanienbeladingstoetse is in die literatuur beskryf (Blaskovics, 1986; Blau *et al.*, 1973; Blitzer *et al.*, 1985). Die beladingstoetse verskil van mekaar met betrekking tot die dosis feniellalanien wat toegedien word, die wyse van toediening, asook die tydsintervalle waarop monsters versamel word.

'n Feniellalanienbeladingstoets is op al die gesinslede van pasiënt L gedoen. Na 'n oornagvas is 'n bloedmonster by elk van die gesinslede geneem, waarna 'n hoeveelheid van 100 mg feniellalanien per kilogram liggaamsmassa in lemoensap oraal toegedien is. Na afloop van 4 ure is 'n verdere bloedmonster geneem. Al die bloedmonsters is in EDTA-buise versamel en plasmamonsters is aan kwantitatiewe aminosuuranalise, soos uiteengesit in Afdeling 3.2.2, onderwerp.

Ter illustrasie van die opvallende biochemiese verskil tussen normale individue en HPA-pasiënte, voor en na die toediening van feniellalanien, word aminosuurprofile van pasiënt L in vergelyking met dié van 'n normale individu in Figuur 5.5 getoon. 'n Uiteensetting van die resultate van die beladingstoets word in Tabel 5.1 gegee. Die plasmavlakke van feniellalanien en tirosien, voor en na die belading, word hierin vervat.

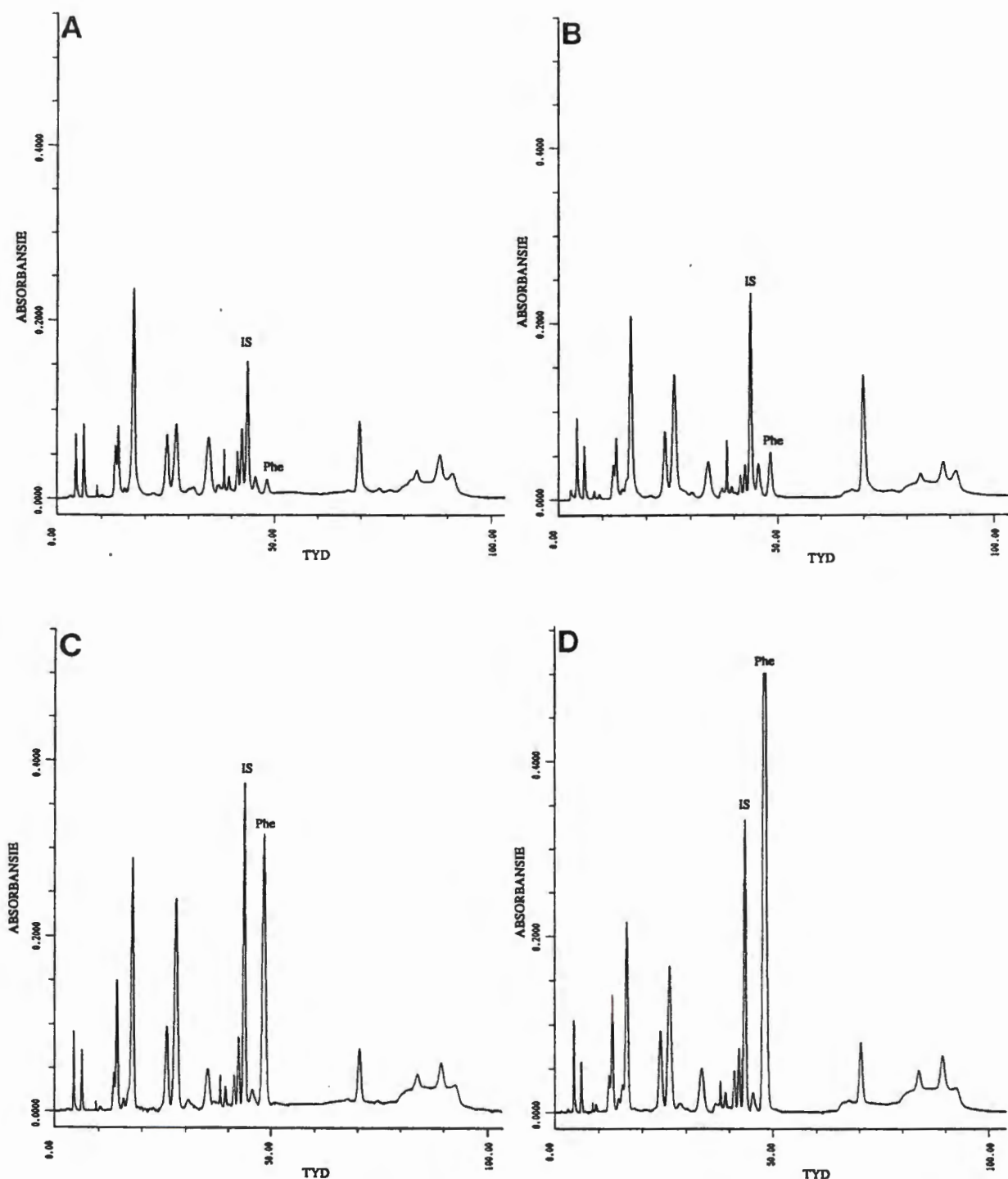


Fig. 5.5

Vergelyking tussen die plasmafenielalanienvlakke voor en vier ure na belading met fenielalanien by 'n normale individu en pasiënt L.

A: Normale persoon voor belading.

B: Normale persoon na belading.

C: Pasiënt L voor belading.

D: Pasiënt L na belading.

IS = interne standaard; phe = fenielalanien; tyr = tirosien.

Tabel 5.1 Plasmavlakke van phe en tyr voor en 4 uur na feniellalanienbelading

Persoon	Voor belading		Na belading	
	[Phe]*	[Tyr]*	[Phe]*	[Tyr]*
Pasiënt L	0.42	0.03	1.30	0.03
Vader	0.07	0.07	0.80	0.38
Moeder	0.05	0.05	0.76	0.12
Tweelingbroer	0.03	0.05	0.10	0.07
Ouer broer	0.03	0.04	0.06	0.05
Normale persoon	0.05	0.07	0.11	0.08

*Konsentrasies word in mM aangegee

Uit die resultate was dit duidelik dat pasiënt L se eliminerings tempo van feniellalanien uit die bloed baie laag in vergelyking met die ander gesinslede is. In teenstelling met die verhoging in die feniellalanienkonsentrasie na die belading, is geen styging in die plasmatirosienkonsentrasie by pasiënt L waargeneem nie. Dit dui daarop dat daar wel 'n defek in die omskakeling van feniellalanien na tirosien by pasiënt L voorkom. Na die belading het beide ouers se plasmafeniellalanienvlakke drasties gestyg. Daar het egter omsetting van feniellalanien na tirosien plaasgevind, aangesien 'n toename in hul plasmatirosienvlakke waargeneem is. By die ander twee kinders is 'n effense styging in die feniellalanienvlakke na die belading waargeneem. Hul eliminerings tempo was vinniger as die ouers s'n en omskakeling van feniellalanien na tirosien het normaal voorgekom.

Indien die resultate van bogenoemde beladingstoets met resultate van identiese beladingstoets op PKU-pasiënte (Rampini *et al.*, 1974) vergelyk word, is dit duidelik dat hier nie met 'n geval van feniellketonurie te make is nie. Volgens Rampini en medewerkers was die gemiddelde feniellalanienkonsentrasie van vier PKU-pasiënte wat gevas het 2.3 mM; 4 ure na toediening van feniellalanien het die vlakke tot 3.7 mM gestyg. In teenstelling hiermee, was pasiënt L se vastende feniellalanienkonsentrasie

slegs 0.42 mM en 4 ure na toediening van fenielalanien het dit tot 1.3 mM gestyg. Die twee broers se eliminerings tempo van fenielalanien oor 'n tydperk van 4 ure was hoër as dié van beide ouers, wat moontlik daarop kan dui dat die ouers heterosigoties vir die betrokke siektetoestand is, terwyl die twee seuns onaangetas mag wees.

Die fenielalanienbeladingstoets het die moontlikheid van PKU by hierdie gesin uitgesluit, maar dit kon nie meer inligting oor die presiese aard van HPA verskaf nie. Addisionele analitiese tegnieke, wat spesifiek vir defekte in die sintese en regenerering van die BH_4 -kofaktor toets, word hierna bespreek.

5.3.4 BH_4 - Beladingstoets

Die BH_4 -beladingstoets is 'n metode wat algemeen vir die differensiële diagnose van hiperfenielalaninemie, as gevolg van 'n kofaktordefek gebruik word. Soos aangedui in Figuur 5.1 het 'n BH_4 -beladingstoets deel uitgemaak van die strategie wat gevolg is om die aard van HPA by pasiënt L vas te stel. In BH_4 -defekte pasiënte behoort die plasmafenielalanienkonsentrasie binne 4 tot 6 ure na die toediening van BH_4 te normaliseer (Dhondt, 1984). Verskeie dosisse BH_4 is al op die proef gestel om tussen die verskillende kofaktordefekte te onderskei (Blau, 1988), maar Ponzzone *et al.* (1987) beveel egter aan dat 'n dosis van 20 mg BH_4 /kg liggaamsmassa tussen al die kofaktordefekte behoort te differensieer. Tetrahydrobiopterienbeladings behoort tydens konstant verhoogde fenielalanienvlakke (> 0.4 mM) uitgevoer te word. Indien die fenielalanienvlakke nie voldoende verhoog is nie, behoort 'n gekombineerde phe- BH_4 - beladingstoets gedoen te word (Dhondt, 1984; Güttler *et al.*, 1984).

Die koste verbonde aan BH_4 -beladings is baie hoog en gevolglik is dit slegs op pasiënt L, haar tweelingbroer en een van die ouers uitgevoer. Die tweelingbroer is gekies aangesien uit die fenielalanienbeladings (Afdeling 5.3.3) geblyk het dat hy moontlik onaangetas is en gevolglik as kontrole kon dien. Die toets is ook op een van die

ouers uitgevoer, omdat hulle heterosigoties vir die betrokke toestand behoort te wees. Die moeder was onwillig om aan die toetse deel te neem, maar die vader het ingestem. Ten spyte van die feit dat pasiënt L nie op 'n fenielalanien beperkte dieet was nie, was haar fenielalanienvlakke op daardie stadium slegs matig, tot 'n vlak van 0.42 mM verhoog en is daar in samewerking met dr. N. Blau³ besluit om 'n gekombineerde phe-BH₄ - beladingstoets uit te voer. Pasiënt L was ten tye van die beladingstoets verkouereg en gevolglik het die moontlikheid bestaan dat sy 'n virusinfeksie onderlede het.

Na 'n oornagvas is 'n bloedmonster by elkeen geneem, waarna 'n hoeveelheid van 100 mg phe/kg liggaamsmassa in lemoensap oraal toegedien is. Drie ure later is 'n tweede bloedmonster geneem en direk daarna is 20 mg BH₄/kg liggaamsmassa, in water, oraal toegedien. Verdere bloedmonsters is op 4, 8, 12, en 20 ure na toediening van BH₄ geneem. Die tye waarop monsters versamel is, kon in die geval van die vader en tweelingbroer nie presies nagekom word nie, aangesien hulle nie in die hospitaal wou oornag nie. Sodanige monsters is egter so na as moontlik aan die korrekte tye geneem. Alle bloedmonsters is in EDTA-buise versamel, waarna die aminosuurinhoud van die plasma volgens die prosedure in Afdeling 3.2.2 gekwantifiseer is. Die resultate van die gekombineerde phe-BH₄ - beladingstoets word in Tabel 5.2 weergegee. 'n Grafiese voorstelling van die wisseling in fenielalanien- en tirosienvlakke tydens die beladingstoets word in Figuur 5.6 getoon.

Pasiënt L se vastende fenielalanien- en tirosienvlakke was onderskeidelik 0.62 ± 0.10 mM en 0.050 ± 0.02 mM. Drie ure na die toediening van fenielalanien is haar plasmafenielalanienkonsentrasie op 1.49 ± 0.16 mM gekwantifiseer wat 'n styging van ongeveer 2½ maal verteenwoordig. 'n Effense daling is in haar plasmatirosienkonsentrasie opgemerk. In 'n kort periode (4 ure) na die toediening van BH₄ het daar nie 'n beduidende verlaging in die pasiënt se plasmafenielalanienkonsentrasie ingetree nie. Pasiënt L se tirosienkonsentrasie het vir die duur van die gekombineerde beladingstoets min of meer konstant gebly, maar haar

³ Dr. Nenad Blau. Klinische Chemie Abteilung, Universitäts - Kinderklinik, Steinwiesstrasse 75, CH-8032 Zürich.

feniëlanienvlakke het na die aanvanklike styging eers na afloop van 20 ure genormaliseer. Hierdie resultaat dui daarop dat sy nie op die toediening van BH₄ gereageer het nie.

Tabel 5.2 Plasmavlakke^a van feniëlanien en tirosien tydens die gekombineerde beladingstoets

Persoon	Interval	[Phe] in mM	[Tyr] in mM
Pasiënt L	Pre-phe	0.62 ± 0.10	0.050 ± 0.02
	Pre-BH ₄ (3h na phe)	1.49 ± 0.16	0.04 ± 0.005
	4h na BH ₄	1.20 ± 0.26	0.04 ± 0.006
	8h na BH ₄	1.07 ± 0.17	0.05 ± 0.006
	12h na BH ₄	0.92 ± 0.20	0.04 ± 0.006
	20h na BH ₄	0.74 ± 0.17	0.03 ± 0.006
Vader	Pre-phe	0.076 ± 0.006	0.053 ± 0.006
	Pre-BH ₄ (3h na phe)	0.680 ± 0.100	0.096 ± 0.006
	4h na BH ₄	0.190 ± 0.020	0.170 ± 0.050
	6¾h na BH ₄	0.1	0.096 ± 0.006
	20h na BH ₄	0.08 ± 0.01	0.070 ± 0.010
Tweelingbroer	Pre-phe	0.06	0.047 ± 0.006
	Pre-BH ₄ (3h na phe)	0.210 ± 0.040	0.073 ± 0.015
	4h na BH ₄	0.080 ± 0.006	0.057 ± 0.012
	6¾h na BH ₄	0.070 ± 0.006	0.053 ± 0.006
	20h na BH ₄	0.060 ± 0.010	0.037 ± 0.012

^a Kwantifisering met behulp van outomatiese aminosuuranalise is drie maal gedoen

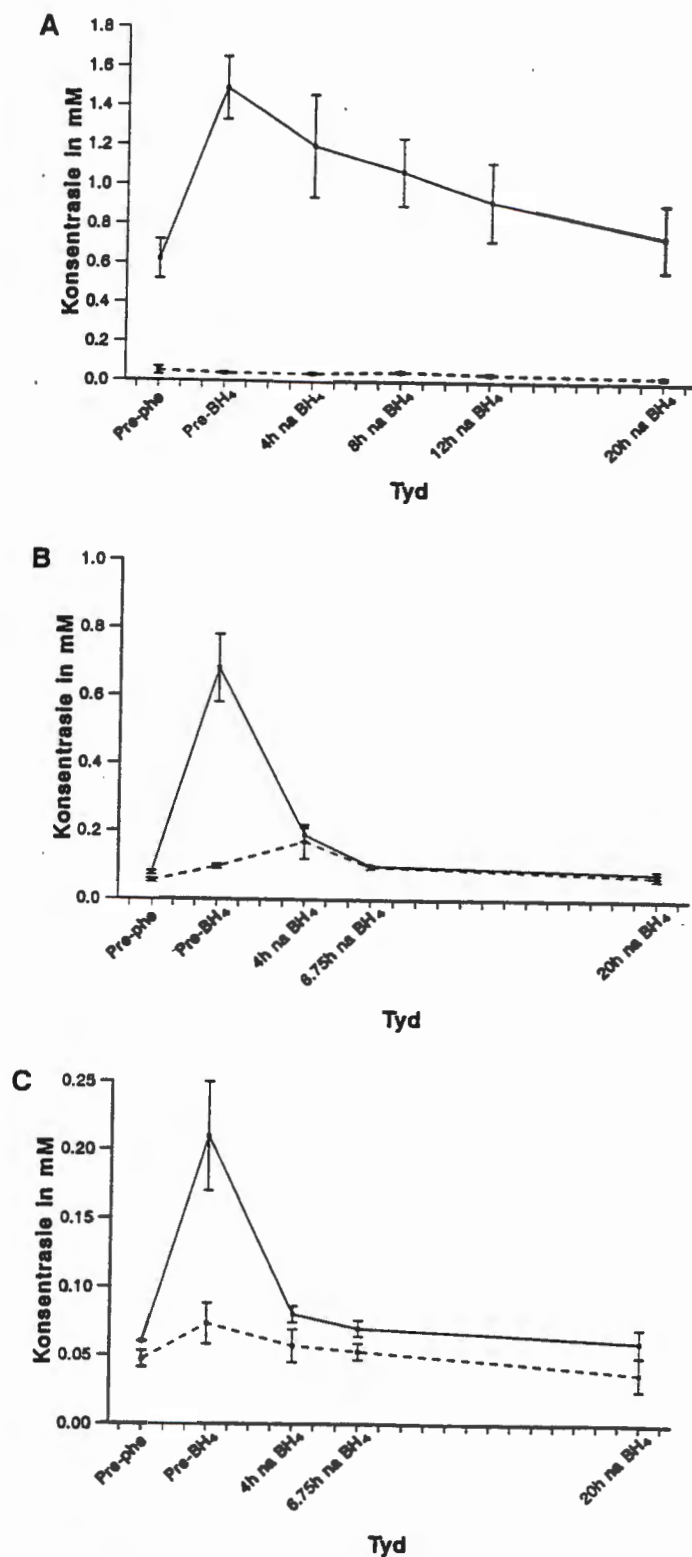


Fig. 5.6 Die effek van die gekombineerde toediening van fenielalanien en tetrahydrobiopterien op die plasmakonsentrasies van fenielalanien en tirosien by pasiënt L (A), die vader (B) en die tweelingbroer (C).
 — Fenielalanien ---- Tirosien

Na die toediening van 100 mg phe/kg liggaamsmassa het die vader se plasmafenielalanienkonsentrasie byna negevoudig toegeneem, terwyl daar 'n verdubbeling in sy plasmatirosienkonsentrasie plaasgevind het. Na afloop van 4 ure na die toediening van BH_4 is 'n aansienlike verlaging in sy plasmafenielalanienvlakke opgemerk, maar 'n onverwagte styging in sy plasmatirosienkonsentrasie is ook waargeneem. Die verlaging in sy plasmafenielalanienvlakke is 'n aanduiding dat hy positief op die toediening van BH_4 gereageer het.

Die tweelingbroer se vastende fenielalanienkonsentrasie van 0.06 mM het $3\frac{1}{2}$ maal gestyg tot op 'n vlak van 0.21 ± 0.04 mM na die toediening van fenielalanien. Binne 4 ure na die toediening van BH_4 het sy fenielalanienvlakke genormaliseer en 'n verdere afname is in die daaropvolgende intervalle opgemerk. Sy plasmatirosienvlak het in ooreenstemming met sy plasmafenielalanien gestyg na die toediening van fenielalanien, waarna dit weer gedaal het na die toediening van BH_4 . Hieruit is dit duidelik dat hy positief op 'n BH_4 -belading gereageer het.

Uit die grafiese voorstellings in Figuur 5.6 is dit duidelik dat pasiënt L se fenielalanienvlakke na die toediening van BH_4 nie genormaliseer het nie. Tydens die belading het haar tirosienvlakke ook min of meer konstant gebly. Dit blyk egter duidelik uit die grafiese voorstellings dat die tweelingbroer se fenielalanienvlakke kort na die toediening van BH_4 genormaliseer het, maar dat normalisering by die vader langer geduur het. Die onverwagte styging in die vader se plasmatirosienkonsentrasie, 4 ure na die toediening van BH_4 , kan moontlik daaraan toegeskryf word dat hy tydens die beladingstoets geëet het.

Uit 'n groep van 51 BH_4 -defekte pasiënte wat deur Niederwieser en medewerkers (1985) getoets is, het al 37 met defekte in die biosintese van BH_4 goed gereageer op die toediening van 7.5 mg BH_4 /kg liggaamsmassa. Tien van die 14 pasiënte met 'n defek in die regenerering van die kofaktor het ook op hierdie dosis gereageer, maar die toediening van BH_4 het glad nie 'n effek op 4 van hierdie pasiënte gehad nie. Dhondt (1984) maak ook melding van 2 DHPR-defekte pasiënte wat nie op 'n dosis

van 7.5 mg/kg gereageer het nie. Dit blyk dus dat 'n BH₄-belading van 7.5 mg/kg goeie resultate by pasiënte met defekte BH₄-biosintese tot gevolg het, maar dat die effek op pasiënte met defekte BH₄-regenerering nie so duidelik na vore kom nie. Om dié rede het Ponzzone *et al.* (1987) aanbeveel dat 'n hoër dosis van 20 mg BH₄/kg liggaamsmassa alle pasiënte met defekte BH₄-regenerering behoort uit te wys. 'n Enkele geval van 'n DHPR-defekte pasiënt wat nie op 'n dosis van 20 mg BH₄/kg liggaamsmassa gereageer het nie, is in die literatuur beskryf (Endres *et al.*, 1987). Daar word na hierdie siektetoestand as "nie-responsiewe" dihidropteridienreduktase-defek verwys.

Die resultate wat met die gekombineerde phe-BH₄ - belading verkry is, sluit die moontlikheid van defekte in die biosintese van BH₄ by pasiënt L uit, terwyl dit moontlik op 'n seldsame vorm van 'n defek in die regenerering van BH₄ mag dui.

5.3.5 Pterienmetaboliete

Analise van urinêre pteriene kan aangewend word vir die differensiële diagnose van defekte in die biosintese en regenerering van die kofaktor, tetrahydrobiopterien. Aangesien die voorkoms en konsentrasie van sekere urinêre pteriene betekenisvol vir die differensiële diagnose van HPA is, is die analise daarvan in die benaderingswyse opgeneem (kyk Figuur 5.1). Soos uiteengesit in Afdeling 2.6.3.2 maak die karakteristieke uitskeidingspatroon van urinêre pteriene dit moontlik om tussen die verskillende BH₄-defekte te onderskei. BH₄-defekte pasiënte skei óf klein hoeveelhede pteriene uit óf groot hoeveelhede van een van die metaboliete wat voor die metaboliese blok voorkom (Blau, 1988). Die vlakke van neopterien en biopterien is van groot belang, aangesien dit die grondslag lê vir die differensiële diagnose van die verskillende BH₄-defekte. Hierdie verhouding gee 'n aanduiding van die posisie in die metaboliese weg waar die ensiemdefek voorkom. Geoksideerde pteriene is hoogs fluoresserend en kan met behulp van HPLC spesifiek en sensitief in uriene, bloed of serebrospinale vloeistof waargeneem word (Fukushima & Nixon, 1980; Matsubara *et al.*, 1984; Niederwieser *et al.*, 1984b; Suzuki & Owada, 1991).

Urienmonsters van pasiënt L, die vader en tweelingbroer wat tydens die gekombineerde phe-BH₄ - beladingstoets versamel is, is vir pterieninhoud geanaliseer. Daar is hoofsaaklik op die vlakke van neopterien en biopterien gekonsentreer, maar die vlakke van isoxantopterien, pterien en monapterien is ook nagegaan. 'n Urienmonster van die ouer broer na 'n oornagvas, is vir dieselfde komponente getoets.

Die urienmonsters is volgens die voorskrifte van Blau en Curtius (1989) soos volg hanteer. Uriene is op vasgestelde tye voor die toediening van fenielalanien en BH₄ versamel, asook in die periode 4 - 8 ure na die toediening van BH₄. As gevolg van die onstabiliteit van tetrahydrobiopterien en ander gereduseerde pteriene is die urienmonsters vooraf geoksideer. Vyf ml van elke urienmonster is in 'n sentrifugeerbuis gepipetteer en die pH is met 'n 6 M soutsuuroplossing op 1.0 - 1.5 ingestel. Hiervoor is 'n pH-meter met 'n glaselektrode gebruik. 'n Hoeveelheid van 100 mg MnO₂ is by elke monster gevoeg en vir 5 minute by kamertemperatuur geskud. Nadat die monsters vir 10 minute by 4000 opm gesentrifugeer is, is elke helder supernatant in 'n skoon buis afgetrek en in aluminiumfoelie toegedraai om dit teen lig te beskerm. Die monsters is by -20°C gestoor totdat analyses daarop uitgevoer kon word. Analise van die pterieninhoud van die geoksideerde urienmonsters is by die Kliniese Chemie laboratorium van die Universiteit van Zürich gedoen⁴.

Die HPLC-metode van Niederwieser *et al.* (1984) vir die bepaling van urinêre pteriene is gebruik. Hierdie gesofistikeerde metode behels kolomomskakeling en fluorometriese deteksie maar vereis minimum voorbereiding van monsters. Nadat die kreatinieninhoud van die urienmonsters bepaal is, is elke urienmonster 5 maal met water verdun, waarna 'n volume van 10 µl direk geanaliseer is. Die opstelling van die apparaat was gebaseer op dié soos dit in die artikel van Niederwieser *et al.* (1984) uiteengesit is en dieselfde analitiese program is gevolg. Kwantifisering van die pterieninhoud is aan die hand van 'n eksterne standaardmengsel gedoen wat uit 2 mM

⁴ Analises is tydens 'n besoek van twee weke aan die Kliniese Chemie-laboratorium uitgevoer.

van elk van neopterien en biopterien, 1 mM isoxantopterien, 0.5 mM pterien en 0.2 mM monapterien in 0.1 M soutsuur saamgestel is. Die konsentrasies van die pterienkomponente in die monster is met behulp van die volgende formule bereken:

$$C_p = 5 \{ [Area_p / Area_s] \times [C_s / K] \}$$

waar C = konsentrasie in mmol/mol kreatinien

p = pterien

s = standaard

K = kreatinienwaarde in mmol/l

Daar is met 'n faktor van 5 vermenigvuldig, aangesien die uriene in die voorbereidingstap 5 maal met water verdun is.

Die pterieninhoud van al die urienmonsters wat tydens die gekombineerde phe-BH₄ - beladingstoets versamel is, is met behulp van die standaardmengsel gekwantifiseer en die resultate word in Tabel 5.3 weergegee. In vergelyking met die normaalwaardes was pasiënt L se vastende urinêre pterienvlakke redelik verhoog. Die vader, tweelingbroer en ouer broer se vastende pterienkonsentrasies was binne normale grense.

Neopterien en biopterien kom normaalweg in 'n verhouding van ongeveer 1:1 voor en gevolglik kan die vastende N/B - verhoudings van die vader, tweelingbroer en ouer broer, met waardes van onderskeidelik 0.88, 1.82 en 1.16 as normaal beskou word. Uit Figuur 2.5 kan afgelei word dat pasiënte met GTP-CH I-defek slegs spoorhoeveelhede pterienkomponente in die uriene uitskei en dus behoort hul N/B - verhouding binne normale grense te val (Scriver *et al.*, 1989). Op hul beurt skei pasiënte met 6-PTS-defek verlaagde hoeveelhede biopterien uit, maar oormatige hoeveelhede van neopterien en monapterien (Niederwieser *et al.*, 1985). Gevolglik word 6-PTS-defekte pasiënte deur 'n baie hoë urinêre N/B - verhouding gekenmerk. In teenstelling met pasiënte met defekte BH₄-biosintese is die neopterienuitskeiding by DHPR-defekte pasiënte betreklik normaal, maar hul biopterienvlakke is verhoog. Dit het tot gevolg dat hul N/B - verhouding gewoonlik laag is (Scriver *et al.*, 1989).

Aangesien pasiënt L se vastende N/B - verhouding van 0.4 relatief laag is, kan dit in ooreenstemming met 'n DHPR-defek gebring word. Die verhoging in haar vastende neopterienkonsentrasie kan moontlik die gevolg van 'n immunereaksie wees, aangesien die pasiënt enkele dae na die gekombineerde beladingstoets in die hospitaal met 'n virusinfeksie opgeneem is.

'n Algehele styging gevolg deur 'n geleidelike afname is in die urinêre pterieninhoud van die drie individue tydens die gekombineerde beladingstoets waargeneem. Die patroon wat die urinêre pteriene tydens hierdie belading gevolg het, is moeilik interpreteerbaar, aangesien daar nie soortgelyke data in die literatuur gedokumenteer is nie. Oor die algemeen kan die resultate wat in Tabel 5.3 vervat is met **DHPR-defek** by die gesin in verband gebring word, aangesien mens by defekte BH_4 -biosintese 'n veel duideliker toename in die biopterien- en pterienvlakke, na die toediening van BH_4 , sou verwag (vergelyk Figuur 2.5).

Figuur 5.7 toon die pterienprofile wat na HPLC-analise verkry is. Hierin word die uitskeidingspatroon van pterienkomponente in urienmonsters van die verskillende gesinslede na 'n oornagvas in vergelyking met die standaardmengsel (A), asook 'n normale uitskeidingspatroon (B) getoon. Pasiënt L, die vader en tweelingbroer se urinêre pteriene word onderskeidelik in C, D en E getoon. Daar is 'n mate van ooreenstemming in die urinêre pterienprofile van die pasiënt (C) en die vader (D), maar hulle verskil duidelik van die normale profiel (B), asook dié van die tweelingbroer (E). Die intense biopterienpiek op pasiënt L se pterienprofiel is aanduidend van 'n DHPR-defek (Niederwieser *et al.*, 1985).

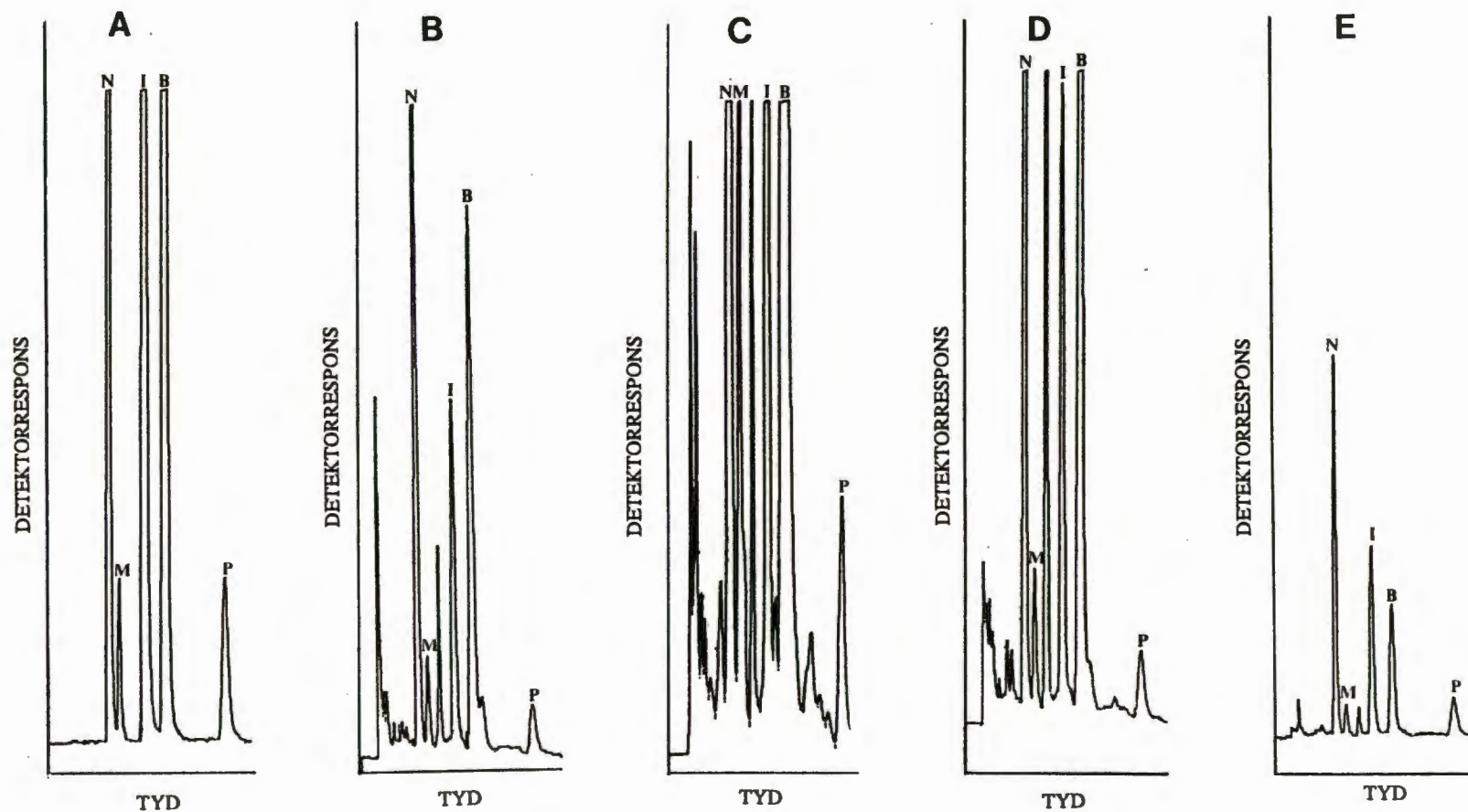


Fig. 5.7 Vergelyking van die chromatografiese skeidings van die pterienstandaard (A) en 'n normale uitskeidingspatroon (B) met die pterien-uitskeidingspatrone van pasiënt L (C), die vader (D) en die tweelingbroer (E).

N = neopterien; M = monapterien; IX = isoxantopterien; B = biopterien en P = pterien.

Tabel 5.3 Urinêre konsentrasies van pterienkomponente tydens die gekombineerde phe-BH₄ - beladingstoets

Persoon	Interval	Kreatinien in mmol/l	N	M in mmol/mol kreatinien	IX	B	P	ΣPt	% B	N/B
Pasiënt L	Pre-phe (vas)	7.07	5.74	0.71	0.43	14.31	0.52	21.70	71.4	0.40
	Pre-BH ₄ (3h na phe)	0.43	7.80	0.91	0.66	21.69	1.31	32.36	73.5	0.36
	1½h na BH ₄	0.8	9.10	1.17	1.03	31.71	6.42	49.43	77.7	0.29
	12h na BH ₄	1.11	8.12	0.95	1.48	28.92	1.62	41.10	78.1	0.28
	19½h na BH ₄	2.04	6.58	1.22	0.94	18.98	1.02	28.74	74.3	0.35
Vader	Pre-phe (vas)	12.53	0.52	0.08	0.08	0.59	0.09	1.36	52.8	0.88
	Pre-BH ₄ (2½h na phe)	17.23	0.63	0.09	0.10	1.29	0.13	2.25	67.1	0.49
	4h na BH ₄	17.89	0.70	0.10	0.38	5.42	6.11	12.71	88.6	0.13
	6¾h na BH ₄	22.44	0.71	0.17	0.89	3.42	0.69	5.87	82.9	0.21
	20h na BH ₄	17.58	0.58	0.11	0.23	0.87	0.19	1.97	60.3	0.67

Persoon	Interval	Kreatinien in mmol/l	N	M in mmol/mol kreatinien	IX	B	P	ΣPt	% B	N/B
Tweeling broer	Pre-phe (vas)	0.65	3.02	0.32	0.32	1.66	0.91	6.24	35.5	1.82
	Pre-BH ₄ (3¼h na phe)	3.39	2.95	0.38	0.37	2.96	0.82	7.47	50.0	0.99
	2h na BH ₄	2.87	3.15	0.52	0.86	7.27	1.72	13.53	69.8	0.43
	6½h na BH ₄	5.74	2.77	0.48	1.81	5.41	1.31	11.78	66.1	0.51
	20h na BH ₄	0.51	3.12	0.96	0.64	1.87	1.39	7.48	37.4	1.67
Ouer broer	Vastend	3.47	1.28	0.15	0.18	1.10	0.23	2.94	46.3	1.16
<i>Normale waardes*</i>										
2-12 mde			1.15-4.0	0.05-0.3		0.47-3.0	0.19-0.6		18 - 63	1
Volwasse			0.1-0.5	0.01-0.07	0.02-0.2	0.22-1.09	0.01-0.31	0.8-1.6	49 - 85	1

N = neopterien; M = monapterien; IX = isoxantopterien; B = biopterien; P = pterien

ΣPt = totale pteriene; %B = 100B/(B + N)

* Niederwieser *et al.* (1987)

'n Semilogaritmiese plot (Figuur 5.8) van persentasiebiopterien versus biopterienekskresie kan gebruik word om tussen die verskillende vorme van HPA te onderskei (Blau, 1988). Alhoewel pasiënt L se vastende waardes van die betrokke metabolietkomponente nie binne die grense van 'n spesifieke defek val wanneer dit op hierdie wyse geplot word nie, groepeer dit wel in die omgewing van DHPR-defek. Aangesien die hoë neopterienkonsentrasie by die pasiënt moontlik aan 'n virusinfeksie toegeskryf kan word, kan die aanname gemaak word dat haar neopterienkonsentrasie binne normale grense sou wees by die afwesigheid van infeksie. Deur die boonste normaalwaarde van neopterien en werklike waardes van biopterien en kreatinien te gebruik, resorteer pasiënt L onder DHPR-defek. Hierdie resultaat ondersteun die afleiding in Afdeling 5.3.4, naamlik dat pasiënt L moontlik 'n defek in die regenerering van BH_4 het.

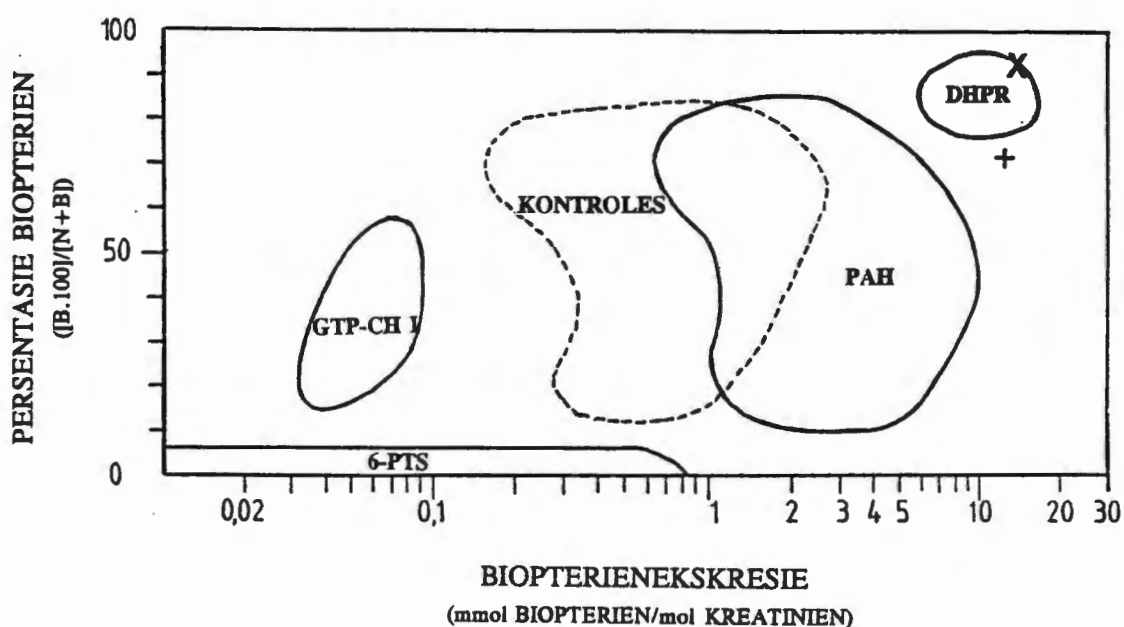


Fig. 5.8 Differensiasie van die verskillende HPA-variante deur gebruik te maak van 'n verspreidingsdiagram van persentasiebiopterien versus biopterienekskresie. Die posisie van die werklike waarde word met "+" aangedui en dié van die aangepaste waarde met "x".

DHPR = dihidropteridienreduktase-defek

PAH = fenilalanienhidroksilase-defek

GTP-CH I = guanosientrifosfaat-siklohidrolase I-defek

6-PTS = 6-piruvoïeltetrahydropterinsintetase-defek.

5.3.6 Bepaling van hoeveelheid aktiewe BH₄

Die pteriene wat in die afdeling hierbo getoets is, is onderskeidelik afbraakprodukte van komponente in die biosintese-weg van BH₄ en metaboliëte van die onaktiewe vorm van die betrokke kofaktor. Kwantifisering van die pterienkomponente gee dus 'n indirekte aanduiding van die status van BH₄-biosintese en -regenerering, maar is geen direkte aanduiding van die hoeveelheid aktiewe BH₄ nie. Fukushima en Nixon (1980) het 'n metode ontwikkel waarvolgens gereduseerde vorms van biopterien, en dus aktiewe tetrahydrobiopterien in biologiese vloeistowwe en weefsels geanaliseer kan word. Die metode maak gebruik van differensiële oksidasie van vars urienmonsters onder suur en alkaliese toestande. By suur pH-waardes word beide dihidro- en tetrahydrobiopterien na fluoresserende biopterien omgeskakel. As oksidasie egter onder alkaliese toestande plaasvind, word slegs dihidrobiopterien na biopterien omgeskakel, terwyl tetrahydrobiopterien na nie-fluoresserende materiaal omgeskakel word. Die verskil tussen die biopterienwaardes vir onderskeidelik suur en alkaliese oksidasie gee dan 'n aanduiding van die hoeveelheid aktiewe BH₄ by die betrokke individu.

Die urinêre tetrahydrobiopterieninhoud van pasiënt L is met behulp van bogenoemde tegniek bepaal. 'n Vastende urienmonster, wat direk na versameling gevries is, is volgens 'n aangepaste metode van Fukushima en Nixon (1980) aan differensiële oksidasie onderwerp, waarna dit met behulp van 'n HPLC-metode nagegaan is. Vir suuroksidasie is 100 µl uriene en 150 µl van 'n 0.2 M soutsuuroplossing vermeng. 'n Hoeveelheid van 50 µl jodiumoplossing, wat uit 1 % (m/v) jodium in 2 % (m/v) kaliumjodiedoplossing bestaan het, is by die mengsel gevoeg en by kamertemperatuur gelaat. Na afloop van 60 minute is 50 µl van 'n 2 % (m/v) askorbiensuuroplossing byvermeng om die oormaat jodium te reduceer, waarna die volume tot 1000 µl met water aangevul is. Alkaliese oksidasie van die urinêre pteriene is soos volg uitgevoer : 100 µl 0.2 M NaOH is by 'n gelyke volume uriene gevoeg. 'n Hoeveelheid van 50 µl jodiumoplossing is byvermeng en vir 60 minute by kamertemperatuur gelaat. Die mengsel is daarna met 200 µl van 'n 0.2 M soutsuuroplossing geneutraliseer, waarna 50 µl van 'n 2 % (m/v)

askorbiensuuroplossing daarby gevoeg is. Water is gebruik om die volume tot 1000 μl aan te vul. Die metode van Niederwieser *et al.* (1984) is gebruik om 10 μl van die finale oplossings vir hul pterieninhoud te analiseer. Kwantifisering van die biopterieninhoud is met behulp van 'n eksterne standaard op dieselfde wyse as in Afdeling 5.3.5 gedoen, waarna die persentasie aktiewe tetrahydrobiopterien soos volg bepaal is :

$$\% \text{ BH}_4 = \{(\text{B}_{\text{suur}} - \text{B}_{\text{alkalic}})/\text{B}_{\text{suur}}\} \times 100$$

waar BH_4 = aktiewe tetrahydrobiopterien

B = biopterien

Die waardes in Tabel 5.3 is gebruik om die gemiddelde biopterieninhoud te bereken, waarna die persentasie geoksideerde biopterien met behulp van die volgende formule bepaal is :

$$\% \text{ B} = \{\text{B}/[\text{B} + \text{N}]\} \times 100$$

waar B = biopterien

N = neopterien

Die biopterieninhoud van die vastende urienmonster wat onder suurkondisies geoksideer is, is op 10.27 $\mu\text{mol/l}$ bereken, terwyl die biopterieninhoud in die alkalies geoksideerde uriene op 8.49 $\mu\text{mol/l}$ vasgestel is. Hierdie waardes is gebruik om die persentasies aktiewe tetrahydrobiopterien (% BH_4) en geoksideerde biopterien (% B) by pasiënt L te bereken. Die berekende waardes word in Tabel 5.4 in vergelyking met die normaalwaardes getoon.

Tabel 5.4 Vlakke van aktiewe BH_4 en geoksideerde biopterien

Persoon	% Aktiewe tetrahydrobiopterien	% Geoksideerde biopterien
Pasiënt L	17 %	75 %
Normale individu	> 50 %	32 - 65 %

Die Kliniese Chemielaboratorium van die Universiteit van Zürich, waar die analyses uitgevoer is, beskou % BH₄-waardes groter as 60 % as normaal. Scriver *et al.* (1989) noem dat meer as 50 % van die biopterien by normale individue in die aktiewe tetrahidrovorm behoort te wees. Niederwieser *et al.* (1985) lys die normale % B-waarde vir kinders van die ouderdomsgroep 6 maande tot 6 jaar as 32 - 65. In vergelyking met die normale hoeveelhede BH₄ by kinders van dieselfde ouderdom as pasiënt L, was die betrokke pasiënt se waardes drasties verlaag. Hierdie resultaat bevestig sonder enige twyfel dat pasiënt L 'n tekort aan aktiewe, ten volle gereduseerde tetrahidrobiopterien het. Verder dui die verhoogde vlakke geoksideerde biopterien (% B) moontlik op defekte DHPR, aangesien die geoksideerde kofaktor nie na die gereduseerde vorm geregenereer kan word nie. By pasiënte met defekte in die biosintese van BH₄ sou mens verwag dat die vlakke van beide gereduseerde tetrahidrobiopterien en geoksideerde biopterien verlaag sou wees.

Pasiënt L se uitskeidingspatroon van urinêre pteriene (kyk Afdeling 5.3.5), asook haar verlaagde vlakke aktiewe BH₄ kan met DHPR-defek in verband gebring word.

5.3.7 Analise van serebrospinale vloeistof

5.3.7.1 *Derivate van senuwee - oordragstowwe*

Aangesien tetrahidrobiopterien 'n essensiële komponent in die hidroksilering van die aromatiese aminosure is, sal 'n BH₄-defek nie alleen die hidroksilering van fenielalanien affekteer nie, maar wel ook dié van tirosien en triptofaan (McInnes *et al.*, 1984; Blau, 1988). Soos reeds genoem in Afdeling 2.4.1, is die sintese van die senuwee-oordragstowwe dopamien, epinifrien, nor-epinifrien en serotonien afhanklik van die hidroksilering van tirosien en triptofaan en gevolglik sal 'n defek in die sintese of regenerering van BH₄ tot verlaagde vlakke van hierdie senuwee-oordragstowwe lei (Hoganson *et al.*, 1984). Metaboliete van dopamien en serotonien in serebrospinale vloeistof reflekteer die sintese van die betrokke voorgangers en

verskaf gevolglik inligting met betrekking tot die BH₄-status. Homovanilliensuur en 5-hidroksi-indoolasynsuur, wat onderskeidelik metaboliëte van dopamien en serotonien is, kan maklik met behulp van die HPLC-metode van Blau *et al.* (1989) geskei en gekwantifiseer word.

Die vlakke van HVA en 5-HIAA in die serebrospinale vloeistof van pasiënt L is met behulp van bogenoemde HPLC-metode gekwantifiseer.

Die serebrospinale vloeistof is by lae fenielalanienvlakke sonder dieetterapie deur middel van 'n lumbale punksie in 'n EDTA-buis versamel. Die monster is by -20°C gestoor totdat dit geanaliseer kon word. Direk voor analise is die monster ontdooi, waarna 20 µl van 'n 30 % (m/v) trichloorasynsuuroplossing by 200 µl serebrospinale vloeistof gevoeg is om die proteïene te presipiteer. Na sentrifugering is die supernatant afgetrek en die laaste proteïene is met behulp van sentrifugale filtrasie deur Millipore Ultrafree-MC-filters verwyder. Die helder filtraat is met behulp van die HPLC-metode van Blau *et al.* (1989) geanaliseer. Die metode maak van omgekeerde fase HPLC met elektrochemiese deteksie gebruik. Die opstelling van die apparaat was soos uiteengesit in bogenoemde artikel en dieselfde analitiese program is gevolg. Konsentrasiebepaling van HVA en 5-HIAA is met behulp van eksterne standaard kwantifisering gedoen.

Figuur 5.9 toon die skeidingspatroon van metaboliëte van senuwee-oordragstowwe in serebrospinale vloeistof van pasiënt L (paneel A) in vergelyking met 'n standaard, wat 540 nmol/l 5-HIAA en 686 nmol/l HVA bevat (paneel B) en 'n normale profiel van 'n driejarige kind (paneel C). Die verskuiwing van die basislyn op die chromatogram wat in paneel A getoon word, is die gevolg van steuring van ander gelaaide komponente wat in pasiënt L se serebrospinale vloeistof teenwoordig was. Selfs by herhaling van die analise kon die invloed van hierdie steurende komponente nie uitgeskakel word nie. Die konsentrasies van homovanilliensuur en 5-hidroksie-indoolasynsuur in serebrospinale vloeistof van pasiënt L is onderskeidelik op 6.6 nmol/l en 43.5 nmol/l bereken.

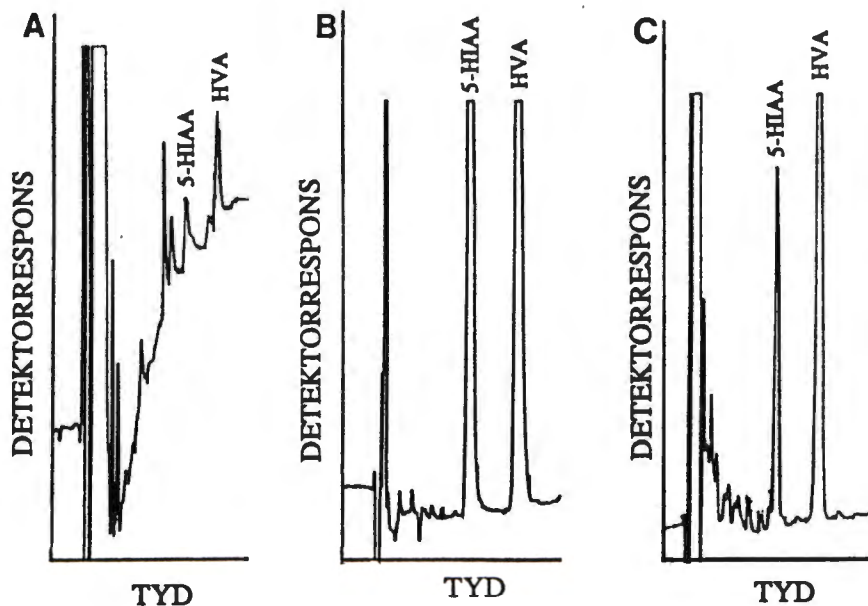


Fig. 5.9 Chromatografiese skeiding van metaboliete van senuwee-oordragstowwe in serebrospinale vloeistof van pasiënt L (A) in vergelyking met 'n standaard (B) en 'n normale profiel (C).
HVA = homovanilliensuur; 5-HIAA = 5-hidroksie-indoolasynsuur.

Die normale vlakke van HVA en 5-HIAA by jong kinders is onderskeidelik 300 - 1000 nmol/l en 100 - 400 nmol/l (Endres *et al.*, 1987). In vergelyking met hierdie waardes is pasiënt L se vlakke van dié twee senuwee-oordragstofmetaboliete drasties verlaag. Aangesien die betrokke metaboliete die status van senuwee-oordragstowwe weerspieël, kan pasiënt L se lae vlakke met 'n defek in die hidroksilering van aromatiese aminosure in verband gebring word. Hierdie resultaat dui dus indirek op 'n BH_4 -defek by pasiënt L. Verder kan pasiënt L se swak neurologiese toestand moontlik aan die gebrek aan hierdie senuwee-oordragstowwe toegeskryf word.

5.3.7.2 Pterienmetaboliete in serebrospinale vloeistof

Bepaling van pteriene in serebrospinale vloeistof is belangrik om die effek van BH_4 -terapie te evalueer (Suzuki & Owada, 1991) en vir die differensiële diagnose van die verskillende vorme van 6-PTS-defek (Blau, 1988). Alhoewel die analise van pteriene in serebrospinale vloeistof nie van primêre belang vir hierdie studie was nie, was daar

genoeg monster om die analise uit te voer.

'n Hoeveelheid van 200 μl serebrospinale vloeistof is onder aangesuurde kondisies met 1mg MnO_2 geoksideer. Die verlangde pH is met 30 μl van 'n 1M soutsuuroplossing bewerkstellig. Nadat die oplossing vir ongeveer een minuut by kamertemperatuur geskud is, is die MnO_2 afgeswaai. Die helder supernatant is volgens die HPLC-metode wat in Afdeling 5.3.5 vir die analise van urinêre pteriene gevolg is vir neopterien en biopterien geanaliseer.

Met behulp van eksterne standaard kwantifisering is die vlakke van neopterien en biopterien onderskeidelik op 25.1 nmol/l en 48.8 nmol/l bereken. In vergelyking met die normaalwaardes was die vlakke van neopterien en biopterien in serebrospinale vloeistof van pasiënt L verhoog. Endres *et al.* (1987) lys die normale konsentrasies van neopterien en biopterien in serebrospinale vloeistof onderskeidelik as 9 - 20 nmol/l en 10 - 26 nmol/l.

Alhoewel die hoë biopterienkonsentrasie by pasiënt L tipies van 'n DHPR-defek is, klop die hoë neopterienkonsentrasie nie met die algemene patroon van die spesifieke siektetoestand nie (Blau, 1988). Die hoë neopterienkonsentrasie kan egter moontlik aan 'n infeksie toegeskryf word (Sciver *et al.*, 1989).

5.3.7.3 Vlakke van fenielalanien en tirosien in serebrospinale vloeistof

Dit is voorgestel dat 'n oormaat fenielalanien moontlik die transport van ander essensiële aminosure na die brein kan belemmer, aangesien 'n gemeenskaplike transportsisteem betrokke is (Berry *et al.*, 1982). Die verlaagde beskikbaarheid van sekere aminosure kan 'n effek op proteïensintese hê en moontlik ook die neurologiese toestand van HPA-pasiënte affekteer.

Serebrospinale vloeistof van pasiënt L is met behulp van outomatiese aminosuuranalise nagegaan om die fenielalanien- en tirosienvlakke vas te stel. 'n

Hoeveelheid van 5 mg sulfosalisielsuur is by 100 μl serebrospinale vloeistof gevoeg om die proteïene te presipiteer. Nadat die monster vir 15 minute by 10°C gelaat is, is die proteïenmateriaal afgeswaai en die helder supernatant geanaliseer. 'n Biotronik aminosuuranalisesisteen is gebruik en die verkorte program vir van aromatiese aminosure is gevolg.

Pasiënt L se fenielalanienvlakke van 0.162 mM in serebrospinale vloeistof was 18 maal hoër as die gemiddelde waarde van 0.009 mM (Berry *et al.*, 1982). Haar tirosienkonsentrasie van 0.016 mM kan as normaal bestempel word teenoor die gemiddelde waarde van 0.01 mM (Berry *et al.*, 1982).

Hierdie resultaat toon duidelik dat pasiënt L se serebrospinale vloeistof, soos haar plasma (vergelyk Afdeling 5.3.1), verhoogde konsentrasies fenielalanien bevat. Die effek van hierdie verhoogde fenielalanienkonsentrasies op die transport van aminosure na die brein en die moontlike effek hiervan op pasiënt L se neurologiese toestand val buite die bestek van hierdie studie.

5.4 BEPALING VAN DHPR-AKTIWITEIT

Verskeie outeurs (Blau, 1988; Dhondt, 1991; Niederwieser *et al.*, 1986; Blau & Curtius, 1989) wys op die belangrikheid van ensiematiese analyses vir korrekte diagnose van die verskillende vorme van hiperfenielalanienemie. Bepaling van ensiemaktiwiteit as die mees diskriminerende analitiese tegniek, kan die presiese punt van 'n metaboliese defek in die PAH-sisteen uitwys en op grond hiervan kan 'n finale diagnose gemaak word.

Bepaling van fenielalanienhidroksilase-aktiwiteit vereis 'n lewerbiopsie (Scriver *et al.*, 1989), terwyl die aktiwiteit van GTP-CH en 6-PTS in lewerbiopsiemonsters of onderskeidelik in gestimuleerde limfosiete (Blau *et al.*, 1985) en eritosiete (Niederwieser *et al.*, 1986) nagegaan kan word. In teenstelling met die beperkte voorkoms van bogenoemde ensieme in die menslike liggaam, kom die

dihidropteridienreduktase-ensiem wyd verspreid voor en metodes is ontwikkel om die ensiemaktiwiteit in 'n verskeidenheid monstertipes te analiseer (kyk Afdeling 2.6.3.5).

In die benaderingswyse (kyk Afdeling 5.1) is dan ook genoem dat metabolietanalise 'n aanduiding van die moontlike ensiemdefek kan gee, maar dat die voorlopige diagnose met ensiematiese analyses bevestig behoort te word.

Verskillende fisiologiese monsters van pasiënt L en ander gesinslede is met behulp van 'n verskeidenheid analitiese tegnieke vir die teenwoordigheid van metaboliete van feniellalanien nagegaan. Hierdie metabolietanalises het op 'n defek in die regenerering van die kofaktor, tetrahydropterien, gedui. Metabolietanalises het dus 'n defekte DHPR-ensiem as moontlike oorsaak van HPA by pasiënt L uitgewys en gevolglik is die aktiwiteit van hierdie ensiem in al die gesinslede getoets.

Bloeddruppels van die verskillende gesinslede is op Guthrie-filtreerpapierkaarte aangebring, nadat hul vingers met 'n naald geprik is. Die kaarte is by kamertemperatuur gelugdroog, waarna dit in 'n plastieksak by -20°C bewaar is totdat analises daarop gedoen kon word. Die metode van Arai *et al.* (1982) is gebruik om DHPR-aktiwiteit in die gedroogde bloed na te gaan. Hierdie metode berus op die oksidasie van tetrahydropterien na kinonoïed-dihidropterien deur ferrisitochroom c. In die teenwoordigheid van NADH word kinonoïed-dihidropterien terug gereduseer na tetrahydropterien deur DHPR afkomstig van die gedroogde bloed. Die vorming van ferrositochroom c uit die reaksie tussen ferrisitochroom c en tetrahydropterien word dan spektrofotometries by 550 nm nagegaan. 'n Skematiese voorstelling van die reaksie word in Figuur 5.10 getoon.

Om eluate van die gedroogde bloeddruppels op die Guthrie-filtreerpapierkaarte te verkry, is twee skyfies, elk met 'n deursnee van 5 mm, uit die kaarte gepons en in Eppendorf-buise geplaas. 'n Hoeveelheid van 1 ml yskoue 0.15 M KCl is in elke buis gepipetteer en vir 30 minute by $1 - 4^{\circ}\text{C}$ gelaat. Nadat die buise gesentrifugeer is, is die hemoglobieninhoud van die hemolisate met behulp van 'n Sysmex®-sisteem

bepaal, waarna die DHPR-aktiwiteit gemeet is.

Om vir die aanvanklike nie-ensiematiese vorming van ferrositochroom c te kompenseer, is 'n verwysingsreaksiemengsel saamgestel. Hierdie verwysingsmengsel het al die komponente van die toetsstelsel behalwe die ensiem bevat. Die reaksie is deur die byvoeging van 6-metieltehtetrahydropterien in beide die monster- en verwysingskuvette geïnisieer en die verandering in ekstinksie is vir 5 minute in 'n dubbelstraal Perkin Elmer Lambda 2 UV/VIS-spektrofotometer gemonitor. Die samestelling van die reaksiemengsels word in Tabel 5.5 getoon.

Tabel 5.5 Samestelling van die reaksiemengsels wat gebruik is vir die bepaling van DHPR-aktiwiteit in eluate van gedroogde bloeddruppels.

Oplossing	Volume (μl)	
	Monster	Blanko
80 mmol Tris-HCl (pH 7.6)	500	500
Dubbel gedistilleerde water	375	375
0.15 M KCl in 0.1 M HCl	-	40
1 mmol ferrisitochroom c in Tris-HCL (pH 7.4)	50	50
Hemolisaat	40	-
2 mmol NADH in 0.01 M KOH (meng* 5 maal en inkubeer vir 5 min)	25	25
1 mmol 6-MPH ₄ in 0.1 M HCL (meng* 10 maal en monitor vir 5 min by 550 nm)	10	10
Eindvolume	1000	1000

*Dit is uiters belangrik dat elke reaksiemengsel ewe veel en op dieselfde wyse vermeng word.

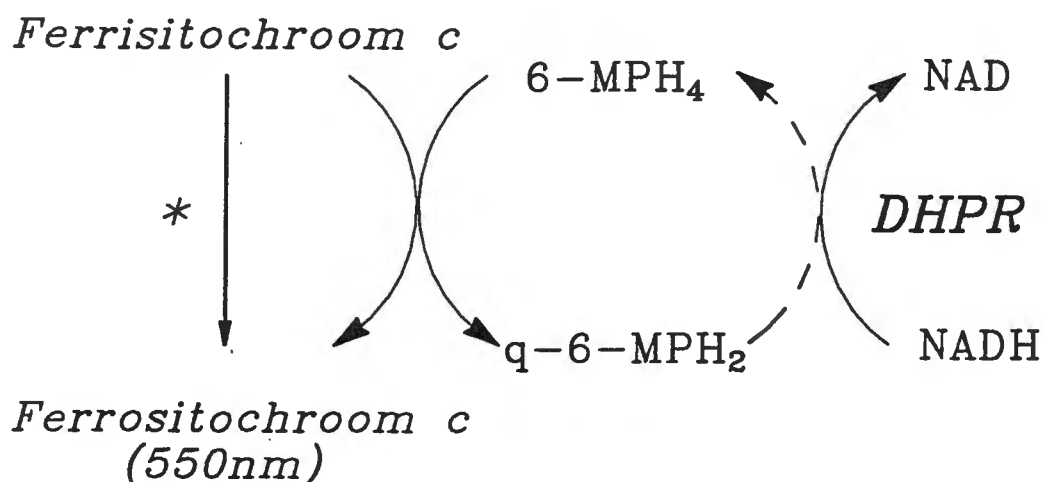


Fig. 5.10 Skematiese voorstelling van die beginsel vir die toetsing van DHPR-aktiwiteit in eritrosiete. Die reaksie wat met 'n asterisk aangetoon word, geskied nie-ensiematies (Ontleen aan Arai *et al.*, 1982).

Die DHPR-aktiwiteit word in milli-eenhede uitgedruk wat soos volg gedefinieer word:

$$\text{mU DHPR/ml} = [1000 \times 1 \times \Delta E/5] / [21 \times 5 \times 0.04]$$

waar : mU = milli-eenhede

1000 = hoeveelheid suiwer DHPR (nmol) wat by die gekose omstandighede 'n waarde van 1 mU gee

1 = Eindvolume in ml

$\Delta E/5$ = Verandering in ekstinksie oor 5 minute

21 = Molêre ekstinksiekoëffisiënt vir sitochroom c by 550 nm

5 = Inkubasietyd in minute

0.04 = Volume hemolisaat in ml

Hierdie formule kan vereenvoudig word tot :

$$\text{mU DHPR/ml} = 238 \times \Delta E/5 \text{ min}$$

Deur die hemoglobieninhoud van die hemolisaat in berekening te bring, kan die DHPR-aktiwiteit uiteindelik as **mU DHPR/mg Hb** uitgedruk word.

Resultate van die hemoglobieninhoud en DHPR-aktiwiteit wat uit die hemolisate van die verskillende gesinslede verkry is, word in Tabel 5.6 gelys. Geen DHPR-aktiwiteit kon in gedroogde bloed van pasiënt L waargeneem word nie. By beide ouers, asook by pasiënt L se tweelingbroer is slegs sowat die helfte van die normale DHPR-aktiwiteit waargeneem. Die DHPR-aktiwiteit van die ouer broer was binne normale grense. Alhoewel pasiënt L se DHPR-aktiwiteit nie-waarneembaar was nie, word dit as < 0.5 mU DHPR/mgHb aangegee, aangesien dit die deteksielimiet van die betrokke analitiese metode is.

Tabel 5.6 Hemoglobieninhoud en dihidropteridienreduktase-aktiwiteit in eluate van gedroogde bloed van pasiënt L en ander gesinslede

Persoon	Hemoglobien (mg/ml)	DHPR (mU/ml)	mU DHPR/mg Hb
Pasiënt L	3.4	nie-waarneembaar	< 0.5
Vader	3.4	6.19	1.8
Moeder	3.8	4.99	1.3
Tweelingbroer	2.4	4.28	1.8
Ouer broer	3.2	10.47	3.3
Normaalwaardes			2 - 5

Bogenoemde resultate dui bo alle twyfel daarop dat 'n defek in die DHPR-ensiem verantwoordelik is vir hiperfenielalanienemie by pasiënt L. Die DHPR-aktiwiteit in gedroogde bloed van beide ouers, asook die tweelingbroer was in ooreenstemming met heterosigose vir dieselfde siektetoestand. Aangesien gedroogde bloed van die ouer broer normale DHPR-aktiwiteit getoon het, kan daarvan afgelei word dat hy onaangetas is deur die betrokke siektetoestand.

5.5 SAMEVATTING

'n Uitsonderlike geval van hiperfenielalanienemie is tydens 'n ondersoek na defekte van die aminosuurmetabolisme opgespoor. Aangesien die presiese aard van HPA nie met behulp van die aanvanklike siftingsprotokol (kyk Hoofstuk 3) vasgestel kon word nie, is 'n benaderingswyse wat die siektetoestand op metaboliese- sowel as ensiemvlak ondersoek, geformuleer. Die doel van hierdie benadering was om die algehele status van metaboliete in die PAH-sisteem te ondersoek en moontlik aan 'n spesifieke siektetoestand te verbind, waarna die diagnose met ensiematiese analise bevestig kon word.

Pasiënt L se plasmafenielalanienvlakke was in verskillende opeenvolgende monsters verhoog en die teenwoordigheid van fenoliese komponente in haar uriene het duidelik op 'n geval van HPA gedui. 'n Fenielalanienbelading het daarop gedui dat die tempo waarteen 'n oormaat phe uit haar bloedstroom verwyder word baie stadig is, maar dat haar fenielalanienvlakke tydens die belading egter nie so hoog gestyg het soos in die geval van PKU-pasiënte nie. Hierdie bevinding, asook die pasiënt se swak kliniese toestand het op 'n ernstiger geval van hiperfenielalanienemie gedui.

Daar is besluit om die moontlikheid van 'n kofaktordefek na te gaan deur van 'n gekombineerde phe-BH₄ - beladingstoets gebruik te maak. Kwantifisering van die fenielalanien- en tirosieninhoud van die plasmamonsers wat tydens die gekombineerde beladingstoets versamel is, het getoon dat pasiënt L nie op die toediening van tetrahydrobiopterien gereageer het nie. Hierdie resultaat, asook die urinêre uitskeidingspatroon van pterienkomponente tydens die beladingstoets, het met 'n defek in die **regenerering** van BH₄ ooreengestem. Analise van die pasiënt se tetrahydrobiopterienvlakke het getoon dat 75 % van die kofaktor in die onaktiewe, geoksideerde toestand en slegs 17 % in die aktiewe, ten volle gereduseerde toestand verkeer het. Die afleiding was dat die defek hoogs waarskynlik die gebrekkige regenerering van die kofaktor as gevolg van 'n defekte dihidropteridienreduktase-ensiem was.

Tetrahydrobiopterien vervul 'n belangrike rol in die sintese van senuwee-oordragstowwe en gevolglik sal 'n BH_4 -defek die status van hierdie stowwe affekteer. Serebrospinale vloeistof van pasiënt L is vir afbraakprodukte van senuwee-oordragstowwe geanaliseer. Die drasties verlaagde vlakke van HVA en 5-HIAA, wat onderskeidelik van dopamien en serotonien afkomstig is, het verder bevestig dat pasiënt L 'n BH_4 -defek het.

Die verskillende metabolietanalises het 'n defekte DHPR-ensiem as die moontlike oorsaak van hiperfenielalanienemie by pasiënt L uitgewys. Gedroogde bloed van al die gesinslede is met behulp van 'n spektrofotometriese analise vir DHPR-aktiwiteit getoets. Hierdie ensiematiese analise het bevestig dat pasiënt L oor geen DHPR-aktiwiteit beskik nie. By beide ouers, asook by pasiënt L se tweelingbroer is slegs sowat die helfte van die normale DHPR-aktiwiteit waargeneem, wat daarop dui dat hulle heterosigoties vir die betrokke siektetoestand is. Pasiënt L se ouer broer het egter normale DHPR-aktiwiteit getoon en blyk dus onaangetas te wees.

Aangesien pasiënt L tydens die kofaktorbelaastingstoets nie op die toediening van 'n hoë dosis BH_4 gereageer het nie, word daar na die betrokke siektetoestand as nie-responsiewe DHPR-defek verwys.

HOOFSTUK 6

BESPREKING

6.1 SIFTING VIR DEFEKTE AMINOSUURMETABOLISME

Die gebruik van 'n enkele analitiese tegniek vir die opsporing van metaboliese siektetoestande wat die gevolg van defekte aminosuurmetabolisme is, is nie voldoende nie (Bremer *et al.*, 1981). 'n Siftingsprogram wat deur die Departement Biochemie aan die PU vir CHO geloods is, het derhalwe van 'n tweeledige siftingsprotokol gebruik gemaak om vir hierdie siektetoestande te toets. As eerste benadering is eendimensionele dunlaagchromatografie gebruik om 'n kwalitatiewe aanduiding van die fisiologiese aminosuurninhoud te verkry. Tweedens is monsters wat moontlike abnormaliteite getoon het verder met behulp van outomatiese aminosuuranalise gekwantifiseer.

Oor 'n periode van twee jaar is fisiologiese monsters van 1443 neonatale en pediatriese pasiënte met ongewone kliniese simptome deur geneeshere vir hierdie gespesialiseerde analyses na die metabolismelaboratorium van die Departement Biochemie verwys. Tydens die ondersoek is verskeie biochemiese abnormaliteite opgespoor. Die belangrikste bevindings van hierdie twee jaar lange ondersoek is die volgende :

- ◆ 23 % van die fisiologiese monsters, wat met behulp van 1D-DLC getoets is, het moontlike abnormaliteite getoon.
- ◆ Ongeveer 35 % van die monsters het verhoogde konsentrasies van een of meer aminosure bevat.
- ◆ By 15 van die 1443 pasiënte kon die abnormale resultate met 'n bekende aminosuurdefek in verband gebring word.
- ◆ Sewe verskillende siektetoestande, wat die gevolg van defekte

aminozuurmetabolisme is, is opgespoor.

- ◆ Hiperfenielalaninemie het die hoogste insidensie getoon.
- ◆ Die eerste geval van HPA onder die swart populasie in die Republiek van Suid-Afrika is tydens hierdie studie opgespoor.
- ◆ Sowat 13 % van die urienmonsters het atipiese ninhidrien positiewe komponente bevat wat nie met bekende defekte van die aminozuurmetabolisme geassosieer word nie.

Kwalitatiewe resultate wat van eendimensionele dunlaagchromatografie verkry is en kwantitatiewe resultate van outomatiese aminozuuranalises, het goed gekorreleer. In elk van die gevalle waar 'n positiewe diagnose gemaak is, is 'n abnormale dunlaagskeiding deur verhoogde aminozuurvlakke met behulp van outomatiese aminozuuranalise bevestig.

Die insidensie van defekte aminozuurmetabolisme by hoërisiko pasiënte is tydens hierdie studie op ongeveer 1:100 vasgestel. Alhoewel resultate van verskeie siftingsprogramme wat elders in die wêreld onderneem is in die literatuur bespreek word, is dit moeilik vergelykbaar met dié van hierdie studie (Wilcken & Smith, 1980; Lemieux *et al.*, 1988; Scriver *et al.*, 1989). Die meeste ander siftingsprogramme is op **populasiesifting** van alle pasgebore babas óf op die opsporing van 'n **spesifieke defek** soos PKU gemik, terwyl daar vir hierdie studie op **hoërisiko** individue gekonsentreer is. Om dié rede is die insidensiesyfer wat met hierdie studie verkry is, nie met die insidensiesyfers van ander siftingsprogramme vergelykbaar nie.

Alhoewel die kliniese kriteria vir die verwysing van pasiënte wat die risiko loop om 'n metaboliese siektetoestand onderlede te hê goed gedefinieer is, het dit in sommige gevalle gebeur dat hierdie kriteria nie in ag geneem is by die verwysing van pasiënte nie. Die lae insidensie defekte aminozuurmetabolisme onder hoërisiko individue wat tydens hierdie studie na vore gekom het, kan moontlik aan swak kliniese seleksie toegeskryf word.

In teenstelling met 'n bevinding van 'n vroeëre onafhanklike ondersoek (Op't Hof &

Hitzeroth, 1987) blyk dit dat HPA meer algemeen onder die Suid-Afrikaanse populasie voorkom as wat aanvanklik vermoed is. 'n Derde van die pasiënte wat positief vir defekte van die aminosuurmetabolisme gediagnoseer is, het gevalle van hiperfenielalanienemie verteenwoordig. Twee van hierdie pasiënte was van Negroïde afkoms en alhoewel een van die pasiënte gesterf het voordat die toestand geverifieer kon word, kon die ander geval se toestand aan 'n baie skaars HPA-variant toegeskryf word. Hiperfenielalanienemie en ook die skaars vorme daarvan is dus nie slegs tot die blanke populasie in die Republiek van Suid-Afrika beperk nie.

6.2 ATIPIESE NINHIDRIEN POSITIEWE KOMPONENTE

Groot hoeveelhede urienmonsters wat met behulp van eendimensionele dunlaagchromatografie geanaliseer is, het atipiese ninhidrien positiewe bande getoon. Verder het kwantitatiewe aminosuurprofiel ongewone pieke, wat van hierdie atipiese ninhidrien positiewe komponente afkomstig was, bevat. Die posisie van die atipiese komponente op dunlaagchromatogramme en aminosuurprofiel het nie met dié van bekende fisiologiese aminosure ooreengestem nie en gevolglik is hul teenwoordigheid nie met defekte van die aminosuurmetabolisme geassosieer nie. Aangesien hierdie atipiese ninhidrien positiewe komponente in 'n groot aantal (12.6 %) urienmonsters voorgekom het en hul teenwoordigheid die interpretasie van analitiese resultate bemoeilik het, is die aard en oorsprong daarvan ondersoek. Die belangrikste gevolgtrekkings wat uit hierdie ondersoek na vore gekom het, kan soos volg opgesom word :

- ▲ Behalwe vir kleuring met ninhidrien het die fisies-chemiese eienskappe van die verbinding, wat vir die ontstaan van die atipiese komponente verantwoordelik was, met dié van bekende aminosure verskil.
- ▲ 'n Groot mate van ooreenstemming is in die struktuur van die atipiese komponent en die struktuur van aminosuurkonjugate opgemerk.
- ▲ Die atipiese komponente was algemeen op die urinêre aminosuurprofiel van pasiënte op antibiotikabehandeling teenwoordig.

- ▲ Die ontstaan van die atipiese komponente op aminosuurprofiel word deur sommige soorte penisilline veroorsaak.

Atipiese komponente wat nie alleen ninhidrien positief is nie, maar ook struktureel verwant is aan aminosuurkonjugate, hou die gevaar in dat hulle aangebore metaboliese siektetoestande "naboots". Die teenwoordigheid van hierdie atipiese komponente bemoeilik die interpretasie van analitiese data en kan foutiewe bevindings tot gevolg hê. Vir 'n siftingsprogram waarby ernstig siek pasiënte betrokke is, is hierdie tipe foute ontoelaatbaar en behoort dit sover moontlik uitgeskakel te word.

Hierdie studie het aangetoon dat metaboliëte, afkomstig van sommige soorte penisilline, 'n effek op die ontstaan van ninhidrien positiewe komponente kan hê. Aan die hand van die hoë voorkoms van hierdie komponente en die gevare wat foutiewe resultate as gevolg daarvan inhou, kan daar voorgestel word dat fisiologiese monsters wat aan analises vir die opsporing van metaboliese defekte onderwerp word, nie tydens die neem van medikasie versamel word nie. Verder kan atipiese ninhidrien positiewe bande op dunlaagchromatogramme voortaan as artefakte beskou word en addisionele analises op sodanige monsters is onnodig.

Die doel van hierdie ondersoek was slegs om 'n aanduiding van die aard en oorsprong van die atipiese ninhidrien positiewe komponente te verkry. Alhoewel daar aangetoon is dat die ontstaan daarvan met die inname van sekere soorte penisilline verband hou, is daar nog aspekte met betrekking tot hul struktuur wat opgeklaar behoort te word. So byvoorbeeld bestaan die moontlikheid dat penisilline tydens die analitiese proses degradeer en dat mens gevolglik nie die geheelbeeld sien nie. 'n Gedetailleerde studie van die gedrag van penisilline tydens chemiese analise val egter buite die bestek van hierdie verhandeling. Suwanrumpha *et al.* (1988) noem dat tandem-massaspektrometrie inligting met diagnostiese waarde rondom penisilline, hul metaboliëte en struktureel verwante komponente verskaf. Toekomstige ondersoeke kan moontlik van hierdie gespesialiseerde tegniek gebruik maak om atipiese ninhidrien positiewe komponente te bestudeer.

6.3 'N UITSONDERLIKE GEVAL VAN HIPERFENIELALANIENEMIE

Alhoewel hiperfenielalanienemie een van die mees algemene genetiese siektetoestande onder die Kaukasiese populasie is, kom dit nie algemeen by Negroïde gemeenskappe voor nie. Hierdie groep siektetoestande het ook 'n lae insidensie onder die Suid-Afrikaanse bevolking en gevolglik was die geval van 'n swart pasiënt met HPA, wat tydens die siftingsprogram opgespoor is, hoogs uitsonderlik.

Bestudering van die literatuur en korrespondensie met 'n toonaangewende Switserse laboratorium het tot die formulering van 'n benaderingswyse vir die differensiële diagnose van hiperfenielalanienemie gelei. Die belangrikste resultate van die verskillende analyses wat in die benaderingswyse opgeneem is, is die volgende :

- In teenstelling met die normaalwaardes van 0.023 - 0.069 mM het pasiënt L se fenielalanienvlakke tussen 0.466 mM en 0.624 mM gewissel.
- Fenoliese komponente, wat met defekte fenielalanienemetabolisme geassosieer word, was in die pasiënt se uriene teenwoordig.
- 'n Fenielalanienbeladingstoets het daarop gedui dat die pasiënt se eliminerings tempo van die oormaat fenielalanien baie stadig is, maar dat die fenielalanienvlakke nie so hoog styg soos by gevalle van PKU nie.
- Geen reaksie op die toediening van tetrahydrobiopterien is tydens 'n gekombineerde phe/BH₄-beladingstoets by die pasiënt waargeneem nie.
- Pasiënt L se urinêre uitskeidingspatroon van pterienmetaboliete was karakteristiek van 'n DHPR-defek.
- Slegs 17 % van pasiënt L se biopterienkofaktor was in die aktiewe tetrahydrovorm in teenstelling met die normale wat groter as 50 % is.
- Vlakke van HVA en 5-HIAA, wat die status van senuwee-oordragstowwe reflekteer, was drasties verlaag.
- Metabolietanalises het op 'n geval van nie-responsiewe DHPR-defek gedui.
- Ensiemanalises het hierdie diagnose bevestig, aangesien geen DHPR-aktiwiteit in gedroogde bloed van pasiënt L waargeneem is nie.
- Met behulp van ensiematiese analises is heterosigose vir dieselfde

siektetoestand by beide ouers, asook pasiënt L se tweelingbroer aangetoon. Die ander kind was egter onaangetas.

Die onderlinge verband van die data, wat sistematies volgens die benaderingswyse verkry is, kon aangewend word om die presiese aard van hiperfenielalanienemie by die pasiënt te diagnoseer. Differensiële diagnose het onomwonde op 'n geval van DHPR-defek gedui. Aangesien die pasiënt glad nie op die toediening van 'n hoë dosis BH_4 gereageer het nie, word daar na die spesifieke toestand as **nie-responsiewe DHPR-defek** verwys.

Bestudering van Dhondt (1991) se register, waarin data van alle bekende gevalle van BH_4 -defekte aangeteken is, het die besef laat ontstaan dat hierdie geval meer uitsonderlik is as wat aanvanklik vermoed is. Volgens data in hierdie register is pasiënt L slegs die derde swart pasiënt in die wêreld met DHPR-defek. Die ander twee bekende gevalle is manlike pasiënte en gevolglik is sy die eerste swart vroulike pasiënt met die genoemde defek.

Slegs 'n enkele geval van nie-responsiewe DHPR-defek is in die literatuur gedokumenteer (Endres *et al.*, 1987). Persoonlike kommunikasie met een van die outeurs (Blau) het aan die lig gebring dat die pasiënt, wat in hierdie artikel genoem word, 'n blanke seuntjie is. Pasiënt L is dus nie alleen slegs die **tweede geval van nie-responsiewe DHPR-defek** in die wêreld nie maar ook die eerste swart pasiënt met die betrokke siektetoestand.

Vir die duur van hierdie studie is defekte van die aminosuurmetsbolisme deurgaans op **metabolietvlak** bestudeer. Verder was die oorkoepelende doelstelling om 'n enkele geval van defekte aminosuurmetsbolisme in detail op metabolietvlak te bestudeer, 'n voorlopige diagnose te maak en die diagnose dan op ensiemvlak te verifieer. Opklaring van die mutasie op DNA-vlak is dus nie as 'n vereiste gestel nie.

Die kombinasie van metaboliet- en ensiematiese analises het 'n DHPR-defek as die

oorsaak van HPA by die swart gesin uitgewys. Met hierdie inligting as agtergrond kan toekomstige DNA-analises doelgerig beplan word om die spesifieke mutasie op te klaar. 'n Tipiese benadering sou wees om fibroblastselkulture vanaf velbiopsies van die verskillende gesinslede te kweek en RNA wat uit die selle geïsoleer is vir cDNA-sintese te gebruik. Aangesien die DNA-volgordes van die DHPR-geen en omliggende gebied bekend is, kan geskikte voorvoeders vir PCR gesintetiseer word. Na klonering van die PCR-produk kan die mutasie met behulp van DNA-volgordebepaling blootgelê word. Sodra die mutasievolgorde bekend is, kan addisionele rekombinante DNA-tegnieke aangewend word om ander familieleden vir die spesifieke mutasie te toets.

BIBLIOGRAFIE

ARAI, N., NARISAWA, K., HAYAKAWA, H., & TADA, K. (1982). Hyperphenylalaninemia due to dihydropteridine reductase deficiency : Diagnoses by enzyme assays on dried blood spots. *Pediatrics* 70, 426 - 430. ✓

BERRY, H.K., BOFINGER, M.K., HUNT, M.M., PHILLIPS, P.J. & GUILFOILE, M.B. (1982). Reduction of cerebrospinal fluid phenylalanine after oral administration of valine, isoleucine and leucine. *Pediatric Research* 16, 751 - 755. ✓

BLASCOVICS, M.E. (1986). Diagnosis in relationship to treatment of hyperphenylalaninemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 9, 178 - 182. ✓

BLAU, N. (1988). Inborn errors of pterine metabolism. *Annual Review of Nutrition* 8, 185 - 209. ✓

BLAU, N. & CURTIUS, H-Ch. (1989). Cofactor defects in atypical phenylketonuria. (In Schmidt, B.J. *et al.*, eds. Current trends in infant screening. Amsterdam : Elsevier Science Publishers. p. 95 - 104.) ✓

BLAU, N., CURTIUS, H-C., KUSTER, T., MATASOVIC, A., SCHOEDON, G., DHONDT, J-L., GUIBAUD, P., GIUDICI, T. & BLASKOVICS, M. (1989b). Primapterinuria : A new variant of atypical phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Diseases* 12, 335 - 338. ✓

BLAU, N., JOLLER, P., ATARĚS, M., CARDESA - GARCIA, J. & NIEDERWIESER, A. (1985). Increase of GTP cyclohydrolase I activity in mononuclear blood cells by stimulation : Detection of heterozygotes of GTP cyclohydrolase deficiency. *Clinica Chimica Acta* 148, 47 - 52. ✓

BLAU, N., NIEDERWIESER, A., CURTIUS, H-Ch., KIERAT, L., LEIMBACHER, W., MATASOVIC, A., SCHMIDT, H., COSHUN, T., ÖZALP, I., GUIGLIANI, R., BIASUCCI, G. & GIOVANINNI, M. (1989a). Prenatal diagnosis of atypical phenylketonuria. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 12, 295 - 298. ✓

BLAU, K., SUMMER, G.K., NEWSOME, H.C. & EDWARDS, C.H. (1973). Phenylalanine loading and aromatic acid excretion in normal subjects and heterozygotes for phenylketonuria. *Clinica Chimica Acta* 45, 197 - 205. ✓

BLITZER, M.G., BAILEY-WILSON, J.E. & SHAPIRA, E. (1985). Discrimination of phenylketonurics from persistent hyperphenylalaninemia patients using a simple phenylalanine loading test. *Clinica Chimica Acta* 153, 137 - 142. ✓

BREMER, H.J., DURAN, M., KAMERLING, J.P., PRZYREMBEL, H. & WADMAN, S.K. (1981). Disturbances of amino acid metabolism : Clinical chemistry and diagnosis. München : Urban & Schwarzenberg. p. 222 - 227 & p. 307 - 325. ✓

BREWSTER, T.G., MOSKOWITZ, M.A., KAUFMAN, S., BRESLOW, J.L., MILSTIEN, S. & ABROMS, I.F. (1979). Dihydropteridine reductase deficiency associated with severe neurologic disease and mild hyperphenylalaninemia. *Pediatrics* 63, 94 - 99. ✓

CARUSO, U., CERONE, R., FANTASIE, A.R., SCHIAFFINO, M.C., ZIGNEGO, G. & ROMANO, C. (1989). Plasma amino acids during the first 24 hours of life : Feasibility of early diagnosis in the newborn at risk of amino acid disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 12, 311 - 314. ✓

COTTON, R.G.H., JENNINGS, I., BRACCO, G., PONZONE, A. & GUARDAMAGNA, O. (1986). Tetrahydrobiopterin non - responsiveness in ✓

dihydropteridine reductase deficiency is associated with the presence of mutant protein. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 9, 239 - 243. ✓

DANCIS, J. & COX, R.P. (1989). Errors of lysine metabolism. (In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. New York : McGraw-Hill. p. 665 - 669.) ✓

DHONDT, J-L. (1984). Tetrahydrobiopterine deficiencies : Preliminary analysis from an international survey. *The Journal of Pediatrics* 104, 501 - 508.

DHONDT, J-L. (1991). Register of tetrahydrobiopterin deficiencies. Lille : Université De Lille. p. 1 - 75. ✓

DHONDT, J-L & FARRIAUX, J-P. (1987). Atypical cases of phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics* 146, A38 - A43. ✓

DHONDT, J-L., GUIBAUD, P., ROLLAND, M.O., DORCHE, C., ANDRE, S., FORZY, G. & HAYTE, J.M. (1988). Neonatal hyperphenylalaninemia presumably caused by a new variant of biopterin synthetase deficiency. *European Journal of Pediatrics* 147, 153 - 157. ✓

DHONDT, J-L., LEROUX, B., FARRIAUX, J.P., LARGILLIERE, C. & LEEMING, R.J. (1983). Dihydrobiopterin biosynthesis deficiency. *European Journal of Pediatrics* 141, 92 - 95. ✓

DILELLA, A.G., HUANG, W-M. & WOO, S.L.C. (1988). Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction. *The Lancet* 1, 497 - 499, Mar. ✓

ENDRES, W., IBEL, H., KIERAT, L., BLAU, N. & CURTIUS, H-Ch. (1987). Tetrahydrobiopterin and "non-responsive" dihydropteridine reductase deficiency. *The Lancet* 2, 223, Jul. ✓

EVANS, W.F. (1983). Anatomy and physiology. 3rd ed. Englewood Cliffs, N.J. : Prentice-Hall. p. 350 - 358.

FUKUSHIMA, T. & NIXON, J.C. (1980). Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids. *Analytical Biochemistry* 102, 178 - 188. ✓

GOLDSMITH, L.A. & LABERGE, C. (1989). Tyrosinemia and related disorders. (In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York : McGraw-Hill. p. 547 - 562.) ✓

GÜTTLER, F., LOU, H., LYKKELUND, C. & NIEDERWIESER, A. (1984). Combined tetrahydrobiopterin - phenylalanine loading test in the detection of partially defective biopterin synthesis. *European Journal of Pediatrics* 142, 126 - 129. ✓

GÜTTLER, F. (1980). Hyperphenylalaninemia : Diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase in childhood. *Acta Paediatrica Scandinavica* supplement 280, 7 - 80. ✓

HILL, A., CASEY, R. & ZALESKI, W.A. (1976). Difficulties and pitfalls in the interpretation of screening tests for the detection of inborn errors of metabolism. *Clinica Chimica Acta* 72, 1 - 15. ✓

HOGANSON, G., BERLOW, S., KAUFMAN, S., MILSTIEN, S., SCHUETT, V., MATALON, R., NAYLOR, E. & SEIFERT, W. (1984). Biopterin synthesis defects: Problems in diagnosis. *Pediatrics* 74, 1004 - 1011. ✓

KAUFMAN, S., BERLOW, S., SUMMER, G.K., MILSTIEN, S., SCHULMAN, J.D., ORLOFF, S., SPIELBERG, S & PUESCHEL, S. (1978). Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of bipterin. A variant form of phenylketonuria. *The New England Journal of Medicine* 299, 673 - 679.

KAUFMAN, S., HOLTZMAN, N.A., MILSTIEN, S., BUTLER, I.J. & KRUMHOLZ, A. (1975). Phenylketonuria due to a deficiency of dihydrobiopteridine reductase. *The New England Journal of Medicine* 293, 785 - 790.

KAUFMAN, S., KAPATOS, G., MCINNES, R., SCHULMAN, J.D. & RIZZO, W.B. (1982). Use of tetrahydrobiopterins in the treatment of hyperphenylalaninemia due to defective synthesis of tetrahydrobiopterin : Evidence that peripherally administered tetrahydrobiopterins enter the brain. *Pediatrics* 70, 376 - 380. ✓

KAUFMAN, S., KAPATOS, G., RIZZO, W.B., SCHULMAN, J.D., TAMARKIN, L. & VAN LOON, G.R. (1983). Tetrahydrobiopterin therapy for hyperphenylalaninemia caused by defective synthesis of tetrahydrobiopterin. *Annals of Neurology* 14, 308 - 315. ✓

LEMIEUX, B., AURAY-BLAIS, C., GIGUÈRE, R., SHAPCOTT, D. & SCRIVER, C.R. (1988). Newborn urine screening experience with over one million infants in the Quebec Network of Genetic Medicine. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 11, 45 - 55. ✓

LEVY, H.L. (1989a). Disorders of histidine metabolism. (In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. New York : McGraw-Hill. p. 563 - 576.) ✓

LEVY, H.L. (1989b). Invited editorial : Molecular genetics of phenylketonuria and its implications. *American Journal of Human Genetics* 45, 667 - 670. ✓

LEVY, H.L. (1989c). Hartnup disorder. (*In* Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York : McGraw-Hill. p. 2515 - 2525.)

LOCKYER, J., COOK, R.G., MILSTIEN, S., KAUFMAN, S., WOO, S.L.C. & LEDLEY, F.D. (1987). Structure and expression of human dihydropteridine reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84, 3329 - 3333.

LOU, H.C., GÜTTLER, F., LYKKELUND, C., BRUHN, P. & NIEDERWIESER, A. (1985). Decreased vigilance and neurotransmitter synthesis after discontinuation of dietary treatment for phenylketonuria in adolescents. *European Journal of Pediatrics* 144, 17 - 20.

MAHON, B.E. & LEVY, H.L. (1986). Maternal Hartnup disorder. *American Journal of Medical Genetics* 24, 513 - 518.

MARTIN, D.W., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. & GRANNER, D.K. (1985). Harper's review of biochemistry. 20th ed. Los Altos, Calif. : Lange Medical Publications. p. 14 - 21.

MATSUBARA, Y., HEININGER, J.A. & LIN, Y.Y. (1984). Improved diagnosis of classical vs atypical phenylketonuria by liquid chromatography. *Clinical Chemistry* 30, 278 - 280.

MCINNES, R.R., KAUFMAN, S., WARSH, J.J., VAN LOON, G.R., MILSTIEN, S., KAPATOS, G., SOLDIN, S., WALSH, P., MACGREGOR, D. & HANLEY, W.B. (1984). Biopterin synthesis defect. Treatment with L-Dopa and 5-hydroxytryptophan compared to therapy with a tetrahydrobiopterin. *Journal of Clinical Investigation* 73, 458 - 469.

MILSTIEN, S. & KAUFMAN, S. (1975). Studies on the phenylalanine - hydroxylase system *in vivo*. An *in vivo* assay based on the liberation of deuterium or tritium into the body water from ring-labelled *l*-phenylalanine. *Journal of Biological Chemistry* 250, 4782 - 4785. ✓

MILSTIEN, S., KAUFMAN, S. & SUMMER, G.K. (1980). Hyperphenylalaninemia due to dihydropteridine reductase deficiency : Diagnosis by measurement of oxidized and reduced pterines in urine. *Pediatrics* 65, 806 - 810. ✓

MÖHR, I. (1989). Haplotipe - analise van die PAH-lokus in families met PKU. Potchefstroom. (Verhandeling (M.Sc.) PU vir CHO.) p. 1 - 26. ✓

MUDD, S.H., LEVY, H.L. & SKOVBY, F. (1989). Disorders of transsulfuration. (In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. New York : McGraw-Hill. p. 693 - 734.) ✓

MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A. & RODWELL, C.W. (1988). Harper's biochemistry. 21st ed. Norwalk, Conn. : Appelton & Lange. p. 281 - 305. ✓

NEWSHOLME, E.A. & LEECH, A.R. (1988). Biochemistry for the medical sciences. Chichester : Wiley. p. 390 - 393. ✓

NIEDERWIESER, A., BLAU, N., WANG, M., JOLLER, P., ATARĒS, M. & CARDESA - GARCIA, J. (1984a). GTP cyclohydrolase I deficiency, a new enzyme defect causing hyperphenylalaninemia with neopterin, biopterin, dopamine and serotonin deficiencies and muscular hypotonia. *European Journal of Pediatrics* 141, 208 - 214. ✓

NIEDERWIESER, A., PONZONE, A. & CURTIUS, H-Ch. (1985). Differential diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 8, 34 - 38. ✓

NIEDERWIESER, A., SHINTAKU, H., HASLER, T., CURTIUS, H-Ch., LEHMANN, H., GUARDAMAGNA, O. & SCHMIDT, H. (1986). Prenatal diagnosis of "dihydrobiopterin synthetase" deficiency, a variant form of phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics* 145, 176 - 178. ✓

NIEDERWIESER, A., SHINTAKU, H., LEIMBACHER, W., CURTUIS, H-Ch., HYÁNEK, J., ZEMAN, J. & ENDRES, W. (1987). "Peripheral" tetrahydrobiopterin deficiency with hyperphenylalaninemia due to incomplete 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase deficiency or heterozygosity. *European Journal of Pediatrics* 146, 228 - 232. ✓

NIEDERWIESER, A., STAUDENMANN, W. & WETZEL, E. (1984b). High - performance liquid chromatography with column switching for the analysis of biogenic amine metabolites and pterines. *Journal of Chromatography* 290, 237 - 246.

OKANO, Y., WANG, T., EISENSMITH, R.C., STEINMANN, B., GITZELMANN, R. & WOO, S.L.C. (1990). Missense mutations associated with RFLP haplotypes 1 and 4 of the human phenylalanine hydroxylase gene. *American Journal of Human Genetics* 46, 18 - 25.

OP'T HOF, J. & HITZEROTH, H.W. (1987). Phenylketonuria (PKU) in the RSA. *South African Medical Journal* 71, 538.

PONZONE, A., GUARDAMAGNA, O., FERRARIS, S., BRACCO, G. & COTTON, R.G.H. (1987). Screening for malignant phenylketonuria. *The Lancet* 1, 512 - 513, Febr.

PONZONE, A., GUARDAMAGNA, O., FERRARIS, S., BRACCO, G., NIEDERWIESER, A. & COTTON, R.G.H. (1988). Two mutations of dihydrobiopteridine reductase deficiency. *Archives of Diseases in Childhood* 63, 154 - 157.

RAMPINI, S., VÖLLMIN, J.A., BOSSHARD, H.R., MÜLLER, M. & CURTIUS, H-Ch. (1974). Aromatic acids in urine of healthy infants, persistent hyperphenylalaninemia, and phenylketonuria, before and after phenylalanine load. *Pediatric Research* 8, 704 - 709. ✓

SHINTAKU, H., NIEDERWIESER, A., LEIMBACHER, W. & CURTIUS, H-C. (1988). Tetrahydrobiopterin deficiency : assay for 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase activity in erythrocytes and detection of patients and heterozygous carriers. *European Journal of Pediatrics* 147, 15 - 19. ✓

SCHWARTZ, E.I., KHALCHITSKY, S.E., EISENSMITH, R.C. & WOO, S.L.C. (1990). Polymerase chain reaction amplification from dried blood spots on Guthrie cards. *The Lancet* 2, 639 - 640, Sept. ✓

SCRIVER, C.R. & CLOW, C.L. (1980) Phenylketonuria : Epitome of human biochemical genetics. *The New England Journal of Medicine* 303, 1336 - 1342.

SCRIVER, C.R., KAUFMANN, S. & WOO, S.L.C. (1989). The hyperphenylalaninemias. (In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York : McGraw-Hill. p. 495 - 546.)

SUWANRUMPHA, S., FLORY, D.A. & FREAS, R.B. (1988). Tandem mass spectrometric studies of the fragmentation of penicillins and their metabolites. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 16, 381 - 386.

SUZUKI, K. & OWADA, M. (1991). A simple and sensitive method for the determination of pterines in cerebrospinal fluid. Clinical usefulness for management of tetrahydrobiopterin deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 14, 825 - 830. ✓

TOURIAN, A. & SIDBURY, I.B. (1983). Phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. (In Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. & Fredrickson, D.S., eds. The metabolic basis of inherited disease. 5th ed. Johannesburg : McGraw-Hill. p. 270.) ✓

VALLE, D. & SIMELL, O. (1989). The hyperornithinurias. (In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D., eds. The metabolic basis of inherited disease. 6th ed. New York : McGraw-Hill. p. 599 - 627.) ✓

VASILIADES, J. (1976). Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine : Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex. *Clinical Chemistry* 22, 1664. ✓

WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E.L., HILL, R.L. & LEHMAN, I.R. (1978). Principles of biochemistry. 6th ed. Tokyo : McGraw-Hill. p. 675 - 755. ✓

WILCKEN, B. & SMITH, A. (1980). Urine screening for aminoacidopathies : Is it beneficial? *The Journal of Pediatrics* 97, 492 - 497.

WILCKEN, B., YU, J.S. & BROWN, D.A. (1977). Natural history of Hartnup disease. *Archives of Diseases in Childhood* 52, 38 - 40.

ZUBAY, G. (1986). Biochemistry. Reading, Mass. : Addison-Wesley. p. 3 - 23.

BYLAAG A

MATERIAALLYS

Askorbiensuur	Fluka
Asynsuur	Merck
Asetoon	BDH
Ammoniak	BDH
Aminosuurstandaard	Beckman
Alanien	BDH
Biopterien	Dr B Schircks Laboratories
BSTFA	Elmu Laboratories
n - Butanol	BDH
Diëtieleter	BDH
Dowex 50 WX8	Fluka
Dunlae	Merck (nr 5577)
Etielasetaat	BDH
Etileenglikoolmonometieleter	Merck
Filters (0.2 μ m)	Microgon
Fenielalanien	Sigma
3 - Fenielbottersuur	Riedel-de Haën
Ferrisitochroom c	Sigma (C-7752)
Glisien	SAARCHEM
Glutamien	BDH
5-Hidroksie-indoolasynsuur	Sigma
Histidien	BDH
Homovanilliensuur (HVA)	Sigma
Isoxantopterien	Dr B Schircks Laboratories
Jodium	Fluka
Kaliumchloried	Merck
Kaliumhidroksied	BDH

Kaliumjodied	Fluka
Kreatinien	BDH
Litiumhidroksied	Beckman
Litiumsitraatbuffers	Beckman
Lisien	BDH
Leusien	Merck
Mangaandioksied	Merck
6-Metieltetrahipterien	Dr B Schircks laboratories
Monapterien	Dr B Schircks Laboratories
NADH	Boehringer Mannheim (107735)
Neopterien	Dr B Schircks Laboratories
Ninhidrien	Merck
Natriumasetaat	Merck
Nor - leusien	Sigma
Natriumsulfaat	Merck
Natriumhidroksied	Merck
Permabond SE 30-DF-0.25	Macherey Nagel
Pikriensuur	BDH
pH 2.2-Buffer	Beckman
Prolien	Merck
Pterien	Dr B Schircks Laboratories
Stikstof	Fedgas
Sulfosalisielsuur	BDH
Soutsuur	BDH
Sentrifugale filters	Millipore Ultrafree-MC 10 000 NMWL
Serien	BDH
Tetrahydrobiopterientablette	Dr B Schircks Laboratories
Tindichlorieddihidraat	Carlo Erba
Threonien	Merck
Tirosien	Merck
TMCS	Suppelco
Trichloorasynsuur	Aldrich

Tris	Merck
Valien	Merck
Water	Ultra suiwer water van Millipore Milli-Q
Ysasynsuur	Merck

BYLAAG B

AFKORTINGS

Ala	alanien
ATP	adenosien-5'-trifosfaat
B	biopterien
BH ₄	tetrahydrobiopterien
BSTFA	bis(trimetielsiliel)asetamied
cDNA	komplementêre deoksiribonuleïensuur
1D DLC	eendimensionele dunlaagchromatografie
DHFR	dihydrofolaatreduktase
DHPR	dihidropteridienreduktase
DMPH ₄	dimetieltetrahydropterien
DNA	deoksiribonukleïensuur
DOPA	dihidroksiefenielalanien
FAB-MS	vinnigeatoombombardementmassaspektrometrie
g	gram
g%	gram-persent
GC	gaschromatografie
GC-MS	gaschromatografie-massaspektrometrie
Gln	glutamien
Gly	glisien
GTP	5'-guanosientrifosfaat
GTP-CH I	guanosientrifosfaatsiklohidrolase I
Hb	hemoglobien
HCl	soutsuur
HHH-sindroom	hiperornitien-hiperammoniak-homositrullienurie
5-HIAA	5-hidroksie-indoolasynsuur
His	histidien
H ¹ -KMR	waterstof-kern-magnetieseresonanspektrometrie

HPA	hiperfenielalanienemie
HPLC	hoëdruk vloeistofchromatografie
HVA	homovanilliensuur
IS	interne standaard
KCl	kaliumchloried
kg	kilogram
KR	2'-ketoreduktase
l of ℓ	liter
Leu	leusien
Lys	lisien
m	meter
M	molêr (mol per liter)
M ⁻¹⁵	molekulêre ioon, waarvan 15 atoommassa-eenhede afgesplyt is
Met	metionien
mg	milligram
mg %	milligram-persent
min	minuut
ml	milliliter
mm	millimeter
mM	millimolêr (millimol per liter)
mmol	millimol
MnO ₂	mangaandioksied
6-MPH ₄	6-metieltetrahidropterien
m/v	massa per volume
m/z	massa-tot-lading-verhouding
N	neopterien
Na	natrium
NAD	Nikotienamied-adeniendinukleotied (geoksideerd)
NADH	Nikotienamied-adeniendinukleotied (gereduseerd)
NADP	Nikotienamied-adeniendinukleotiedfosfaat (geoksideerd)

NADPH	Nikotienamied-adeniendinukleotiedfosfaat (gereduseerd)
NaOH	natriumhidroksied
nm	nanometer
nmol	nanomol
opm	omwentelings per minuut
Orn	Ornitien
Ⓟ	fosfaat
PAA	fenielasetaat
PAH	feneilalanienhidroksilase
PCR	polimerasekettingreaksie
phe	feniellalanien
PHPAA	p-hidroksiefenielasetaat
PHPLA	p-hidroksiefeniellaktaat
PHPPA	p-hidroksiefenielpiruvaat
PKU	feniellketonurie
PLA	feniellaktaat
PPA	fenielpiruvaat
Pro	prolien
6-PTS	6-piruvoïeltetrahydropteriensintetase
PU vir CHO	Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys
RNA	Ribonukleïensuur
qBH ₂	kinonoïed-dihidrobiopterien
q-6-MPH ₂	kinonoïed-6-metioldihidropterien
RFLP	restriksie-fragment-lengte-polimorfisme
Ser	serien
SR	sepiapterienreduktase
THFA	tetrahidrofoliensuur
Thr	threonien
TMCS	trimetielchlorosilaan
TMS	trimetielsilaan

TPH	triptofaanhidroksilase
Tris	tris(hidroksiemetiel)aminometaan
Trp	triptofaan
TYH	tirosienhidroksilase
Tyr	tirosien
μl	mikroliter
μm	mikron
Val	valien

BEDANKINGS

Sonder die hulp van verskeie persone en instansies sou die voltooiing van hierdie verhandeling nie moontlik gewees het nie. Hiermee my dankbare erkenning aan :

- *My studieleiers, Prof. W.J. de Wet en Mnr. E. Erasmus vir hul raad en leiding.*
- *Die Departement Biochemie wat die oorsese reis moontlik gemaak het.*
- *Die personeel van die Kliniese Chemie-laboratorium in Zürich, veral Dr. Blau, Lucja en Margrit vir hul vriendelike ontvangs en waardevolle inset.*
- *Die MNR vir finansiële steun tydens hierdie studie.*
- *Prof. Thys Seyffert vir die taalkundige versorging van die verhandeling.*
- *Pieter, vir jou hulp, ondersteuning en voortdurende aanmoediging.*