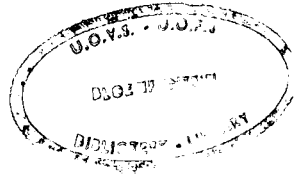


10 243 U 804861



U.O.V.S. - BIBLIOTEK

198408434801220000019



VITAMIEN B₆ METABOLISME IN DIE ERITROSIET MET
ASPARTAATAMINOTRANSFERASE AS BIOLOGIESE MERKER

deur

Elsie Maria Susanna Petronella Schoombie

Hierdie verhandeling word voorgelê ter vervulling
van die vereistes vir die graad
Magister in Mediese Wetenskappe (M.Med.Sc.)
in die Fakulteit Geneeskunde, Departement Chemiese Patologie
aan die Universiteit van die Oranje Vrystaat.

Januarie 1983

Studieleier
H.C. Barnard

Universiteit van die Oranje-Vrystaat

BL. 111

· 3 · 8 · 1984

T 612.111 SCH

BIBLIOTEK

BEDANKINGS

Hiermee wil ek graag my opregte dank betuig aan almal wat my gedurende hierdie studie behulpsaam was, nl.

- Mnr. H.C. Barnard vir sy leiding, geduld, volgehoue aanmoediging en konstruktiewe kritiek gedurende al die stadia van hierdie studie.
- Die Rekensentrum van die U.O.V.S. vir hulp met statistiese verwerkings van resultate.
- Die departement Hematologie van die U.O.V.S. vir hulp met hematologiese ondersoeke.
- Die personeel verbonde aan die departement Chemiese Patologie vir hul morele ondersteuning en aanmoeding.
- Al my kollegas wat getrou bereid was om as proefpersone op te tree.
- Mev. P.N. Bester vir haar opofferings en geduld met die tik van die verhandeling.
- My Skepper vir die talente wat Hy aan my gegee het.

AFKORTINGS

ACD	sitroensuurdekstrose
AST	aspartaataminotransferase
ATP	adenosientrifosfaat
CAS	'Coenzyme-Apoenzyme System'
4'-DOPN	4'-deoksipiridoksien
EDTA	etileendiamientetra-asetaat
fig	figuur
g	gram
Hb	hemoglobien
IE	internasionale eenhede
IFKC	Internasionale Federasie van Kliniese Chemie
K_{ew}	ewewigskonstante
K_m	Michaelis Menten konstante
ℓ	liter
LDH	laktaatdehidrogenase
m (voorvoegsel)	milli
M	molaar
m.AST	mitochondriale aspartaataminotransferase
MDH	malaatdehidrogenase
min	minuut
n (voorvoegsel)	nano
N	normaal
NAD	nikotienamiedadeniendinukleotied
NADH	nikotienamiedadeniendinukleotied (gereduseerd)
pH	-logaritme van die waterstofioonkonsentrasie
PL	piridoksaal -
PLP	piridoksaal-5'-fosfaat
PM	piridoksamien
PMP	piridoksamienfosfaat
PN	piridoksien
PN HCl	piridoksienhidrochloried
PNP	piridoksienfosfaat
PS	piridoksiensuur
rpm	revolusies per minuut

s-AST	sitoplasmiese aspartaataminotransferase
sek	sekonde
SMAC	'Sequential Multiple Analyzer Computer'
TK	transketolase
Tris	tris(hidroksiemetiel)aminmetaan
TPP	tiamienpirofosfaat
V	variasiekoëfisiënt
μ (voorvoegsel)	mikro

INHOUDSOPGAWE

BEDANKINGS	(ii)
AFKORTINGS	(iv)
HOOFSTUK 1 INLEIDING : LITERATUUR OORSIG	1
HOOFSTUK 2 EKSPERIMENTELE PROSEDURES	30
HOOFSTUK 3 VITAMIEN B ₆ DERIVAAT INKUBASIESTUDIES	72
HOOFSTUK 4 INVLOED VAN VITAMIEN B ₆ INNAME DEUR DIE DIEET OP AST AKTIWITEIT	85
HOOFSTUK 5 ALGEMENE BESPREKING	103
VERWYSINGS	115
OPSOMMING	124

HOOFSTUK 1

INLEIDING : LITERATUUR OORSIG

1.1	Inleiding	2
1.2	Die ensiem: Asparaataminotransferase (AST)	4
1.2.0	Inleiding	4
1.2.1	Reaksie gekataliseer deur AST	5
1.2.2	Rol van AST in die sel	6
1.2.3	Piridoksaal-5'-fosfaat se werking as koensiem van AST	7
1.2.4	AST se eienskappe	7
1.2.5	AST se kliniese betekenis	10
1.2.5.1	Normale variasie	10
1.2.5.2	Kliniese variasie	11
1.3	Vitamien B ₆	12
1.3.1	As vitamien (Gesiedenis)	12
1.3.2	Strukture	12
1.3.3	Verspreiding en liggaamsbenodigdhede	13
1.3.4	Rol as koensiem in verskeie reaksies in die liggaam	13
1.4	AST se verband met PLP in kliniese diagnoses	14
1.4.1	AST aktivering in verskillende kliniese toestande...	14
1.4.2	Bepaling van AST aktiwiteit as aanduiding van vitamien B ₆ status in die liggaam	17
1.5	Metabolisme van vitamien B ₆ in die liggaam	19
1.5.1	Vitamien B ₆ metabolisme in die lewer	19
1.5.1.1	Ensieme betrokke	19
1.5.1.2	Effek van vitamien B ₆ tekort	21
1.5.1.3	Effek van vitamien B ₆ oormaat	22
1.5.1.4	Beheer van vitamien B ₆ metabolisme in die lewersel	23
1.5.2	Vitamien B ₆ metabolisme in die eritrosiet	26

HOOFSTUK 1

INLEIDING: LITERATUUR OORSIG

1.1 Inleiding

Eritrosiet Aspartaataminotransferase (AST) aktiwiteit in die bloed word algemeen gebruik as aanduiding van vitamien B₆ status in die liggaam [1, 2, 3]. AST benodig piridoksaal-5-fosfaat (PLP), die aktiewe vorm van vitamien B₆, as koensiem. Die vitamien B₆ status word dan bepaal deur van die "CAS" beginsel (Coenzyme-Apoenzyme-System), voorgestel deur Folkers [4], gebruik te maak. Volgens hierdie beginsel word die spesifieke aktiwiteit van 'n koensiem-apoensiem sisteem, in die teenwoordigheid en afwesigheid van die bygevoegde koensiem, in hierdie geval PLP, bepaal. 'n Betekenisvolle toename in die aktiwiteit van die ensiem sisteem in die teenwoordigheid van die koensiem, is dan 'n aanduiding van 'n tekort aan die koensiem, in die spesifieke weefsel. Hoe groter die toename, hoe groter is die tekort.

Raica en Sauberlich [5] het in 1964 aangetoon, dat die in vitro stimulasie van eritrosiet AST aktiwiteit met PLP, nuttig kan wees in die evaluasie van Vitamien B₆ status in 'n persoon. Verder is ook aangetoon dat serum 'n betekenisvolle hoër konsentrasie vitamien B₆ as leukosiete en eritrosiete bevat, maar dat die sensitiwiteit van serum AST vir vitamien B₆ tekort, baie minder is as die sensitiwiteit van AST in eritrosiete [6].

Die evaluering van vitamien B₆ status deur die bepaling van AST in die eritrosiet, kan verder gemotiveer word deur die feit dat AST onder normale omstandighede in ander weefsel in die liggaam, soos lewer en hartweefsel, versadig is [7], maar nie in die eritrosiet nie.

In 1972 het Sauberlich et al. [6] egter beweer dat AST bepalingmetodes vir die gebruik in voedingstudies en bevolkingsgroep studies onbetroubaar is en dat die ontwikkeling van 'n betroubare gestandaardiseerde metode, die gebruik van AST in die bepaling van Vitamien B₆ tekorte, sal aanmoedig.

'n Gestandaardiseerde metode is in 1977 deur die Internasionale Federasie van Kliniese Chemie (IFKC) [8] opgestel. In die metode is ook aanbeveel dat PLP op 'n roetine basis tydens die bepaling van AST bygevoeg moet word, sodat die totale AST aktiwiteit in 'n monster bepaal kan word. Met die byvoeging van PLP by die bepalingmedium, is nuwe tegniese probleme ondervind. 'n Preinkubasietyd, waartydens die PLP, en die AST in die monster, saam geïnkubeer word, van minstens 10 minute is nodig, voordat maksimum AST aktiwiteit verkry word.

Aangesien PLP, die aktiewe vorm van vitamien B₆, nie as sulks deur die eritrosiet opgeneem kan word nie, is die opname en metabolisme van vitamien B₆ deur die eritrosiet in 1971 deur Anderson en medewerkers [9] ondersoek. Hulle het gevind dat tritium gemerkte piridoksien (PN) wel deur die eritrosiet opgeneem en omgeskakel kan word na PLP. Hulle het egter nie die AST aktiwiteit bepaal om te sien of die PLP so gevorm wel beskikbaar gestel word vir aktivering van AST nie.

Krishnaswamy [10] het in 1971 gevind dat persone van 'n lae sosioekonomiese groep betekenisvol laer AST aktiwiteitsvlakke in vergelyking met persone van die hoë sosioekonomiese groep gehad het en dat die ensiemaktiwiteit toegeneem het na toediening van vitamien B₆. In 1976 het Azuma et al [11], AST aktiwiteit in hemolysate, van persone wat as normale kontroles beskou word, gemeet. Hulle het gevind dat daar by hierdie normale kontroles, 'n tekort aan ensiemaktiwiteit self, sowel as 'n tekort aan PLP is. Dit is in teenstelling met die aanname dat die dieet 'n voldoende vitamien B₆ inname verseker. Met 'n daaglikse aanvulling van 50 mg piridoksienhydrochloried vir drie weke, is die tekort reggestel, maar na

'n verdere drie weke het die spesifieke aktiwiteit verder toegeneem, terwyl die vitamien B₆ tekort steeds reggestel was.

Daar is gevind dat 'n periode van vyf tot elf weke van vitamien B₆ aanvulling nodig is om 'n stabiele vlak van hierdie hoër spesifieke aktiwiteit te bereik. Hierdie lang tydperk mag dui op 'n regulatoriese meganisme van vitamien B₆ op geen uitdrukking, sodat 'n toename in AST vlakke voorkom, in die teenwoordigheid van 'n konstante oormaat vitamien B₆, totdat die ideale AST vlak bereik word [12].

1.2 Die Ensiem

Aspartaataminotransferase=Aspartaattransaminase (AST)

(Glutamaat oxalasetaat transaminase, GOT)

EC 2.6.1.1.; L-aspartaat: 2 oxoglutaraat aminotransferase.

1.2.0 *Inleiding*

AST kom wyd verspreid voor in dierweefsel en is normaalweg teenwoordig in menslike plasma, gal, serebrospinale vloeistof en speeksel, maar nie in die uriene, tensy 'n nierletsel voorkom, nie. AST aktiwiteit in weefsel relatief tot dié in serum, is as volg [13]:

Tabel 1.1

Weefsel	AST aktiwiteit relatief tot dié in serum
---------	--

Hart	7800
Lewer	7100
Skeletspier	5000
Nier	4500
Pankreas	1400
Milt	700
Long	500
Eritrosiet	15
Serum	1

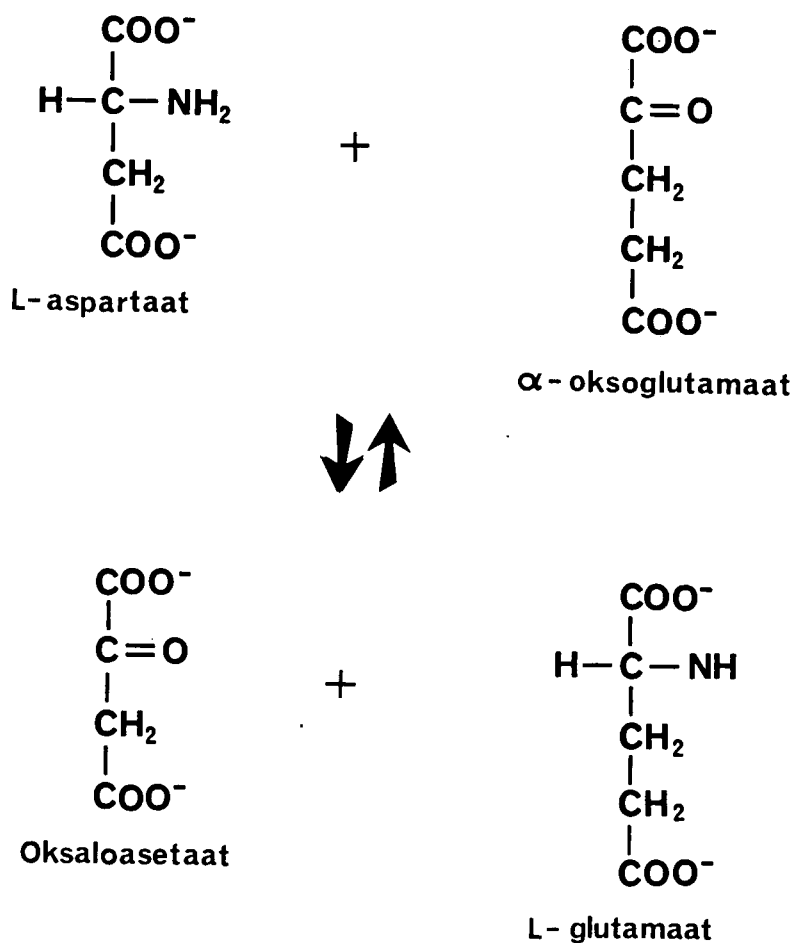
Om hierdie rede word AST aktiwiteit in die bloed algemeen in die klinies, chemiese laboratorium bepaal om verskillende patologiese toestande in die liggaam te help diagnoseer.

1.2.1 *Reaksie gekataliseer deur AST*

Die proses van transaminase behels die intermolekulêre oordrag van 'n aminogroep vanaf 'n α -amino-suur na 'n α -ketosuur sonder dat amoniak gevorm word. Dorothy Needham het die eerste waarneming daarvan in 1930 gemaak toe sy gesien het dat borsspiere, glutamaat en aspartaat metaboliseer sonder 'n afname in die totale stikstofinhoud. Die chemiese reaksie is eerste deur Braunstein en Kritzman [14] in 1937 beskryf. Hulle het gesien dat spierbereidings in die teenwoordigheid van glutamaat, piruvaat omskakel na alanien en oxalasetaat na aspartaat.

Aspartaataminotransferase (AST) kataliseer dus die volgende reaksie:

Fig 1.1



Die ewewig van hierdie reaksie bevorder die vorming van aspartaat.

Aspartaataminotransferase kataliseer ook die aminering van β -sulfoniel piruvaat na L-sisteïensulfonaat en van β -sulfoniel piruvaat na L-sisteïensuur [15] maar die ensiem toon 'n baie lae aktiwiteit tydens hierdie reaksies.

1.2.2 *Rol van AST in die sel.*

Transaminases speel 'n belangrike rol in intermediêre metabolisme want dit is 'n sleutelensiem in die metabolisme van nie-essensiële aminosure. Die drie aminosure glutamaat, aspartaat en alanien, kan deur hul spesifieke aminotransferase ensieme omgeskakel word na die ooreenstemmende α -ketosure wat produkte van koolhidraat metabolisme is en dus geoksideer kan word as bron van energie [16].

AST bevat piridoksaal-5-fosfaat (PLP), gebind deur 'n Schiff-basis binding aan die ϵ -aminogroep van 'n lisiel residu [17], as koensiem. Studies met koensiemanaloe het getoon dat die fosfaat gedeelte [18, 19, 20] en waarskynlik ook die piri-dienring [21, 22] van die PLP struktuur, bydra tot koensiem-binding.

Die kinetika van die binding van PLP aan die apoensiem, is reeds deur verskeie persone ondersoek, maar is nog steeds nie heeltemal duidelik nie. Deur middel van aktiveringsstudies het Bank et al [23] afgelei dat PLP binding in twee stappe plaasvind, naamlik 'n vinnige binding en 'n stadige tempo-bepalende stap. Die tweede stap kan die vorming van 'n kovalente band tussen die apoensiem en koensiem, na die aanvanklike nie-kovalente interaksie wees, of 'n konformasie verandering wat tot die aktiewe ensiem lei, behels. Arrio-Dupont [24] het egter beweer dat die binding 'n vierstap proses is wat ook allosteriese interaksie van die subeenhede van die ensiem behels.

Fonda en Auerback [25] het die tempo van PLP binding aan die apoensiem ondersoek. Hulle het gevind dat anorganiese fosfaat en sy metiel, etiel en feniel esters, die rekombinasie van die apoensiem en koensiem baie effektief inhibeer en dat 'n fosfaat konsentrasie van 0,2-0,4 nM die tempo van koensiem-binding met 50 % inhibeer. Hierdie konsentrasies is laer as die fisiologiese konsentrasie van fosfaat. Hierdie inhibisie vind waarskynlik plaas deurdat die anorganiese fosfaatione, deur elektrostatische interaksie, vir dieselfde ensiemloki as die fosfaatgedeelte van die koensiem, kompeteer.

1.2.3 *Piridoksaal-5'-fosfaat se werking as koensiem van AST.*

Piridoksaal fosfaat (PLP) tree op as 'n prostetiese groep of koensiem, wat aminogroep oordraging deur die vorming van piridoksamien derivate met aminosure [16] medieer. 'n Meganisme is voorgestel waardeur herhaalde omskakeling tussen piridoksaal fosfaat en piridoksamien fosfaat die aminogroep oordra [15], soos aangetoon in fig 1.2

1.2.4 *AST se eienskappe*

In 1959 het Jenkins et al [26] die molekulêre massa van AST, geïsoleer uit varkheart, bepaal. Hy het gevind dat AST 'n molekulêre massa van 110 000 het.

Twee hooffraksies van AST aktiwiteit kon met behulp van elektroforese of chromatografie, in hart en lewer ekstraksies, aangetoon word [27, 28, 29]. Die kationiese komponent word verkry vanaf die mitochondria en die anioniese komponent vanuit die sitoplasma [29]. Die twee isoensieme verskil ook wat betref hul pH optima, substraat affiniteit en immunochemiese eienskappe [28, 29, 30, 31].

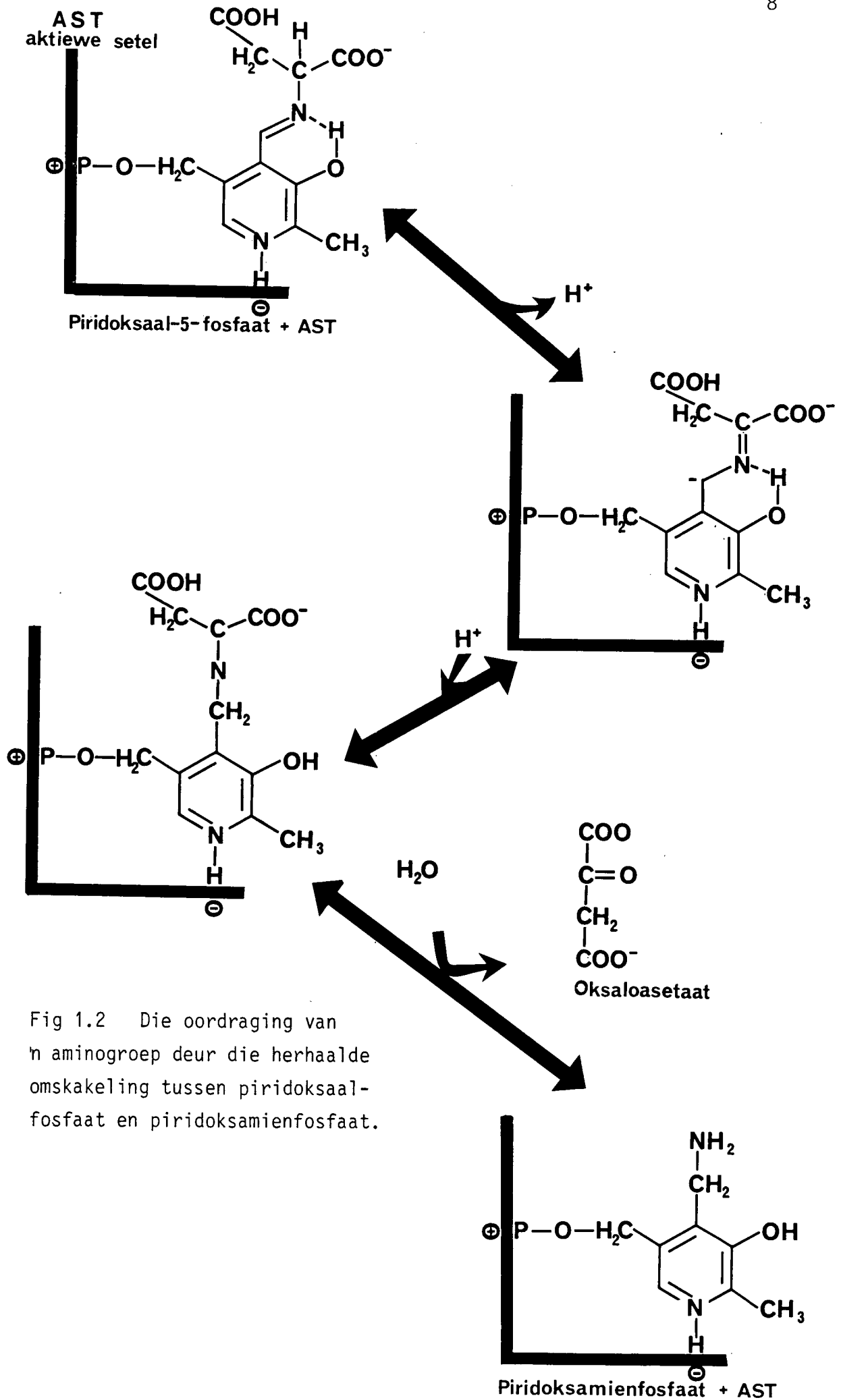


Fig 1.2 Die oordraging van 'n aminogroep deur die herhaalde omskakeling tussen piridoksaal-fosfaat en piridoksamienfosfaat.

Martinez-Carrison en Tiemeier [32] het in 1967 met behulp van AST berei uit varkharte, aangetoon dat die mitochondriale en sitoplasmiese isoensieme, beide uit twee polipeptiedkettings bestaan en dieselfde molekulêre massas ($\pm 100\ 000$) het. Die isoensieme verskil egter wat hul aminosuursamestelling, peptied tipering en tripsien vertering betref en is dus nie identies nie. Die sitoplasmiese ensiem se stikstof terminale aminosuur is alanien en dié van die mitochondriale ensiem is serien. Die twee ensieme verskil verder deurdat die mitochondriale isoensiem meer hitte stabiel is, maar word weer, anders as die sitoplasmiese fraksie, geïnhibeer deur fosfaat [32, 33, 34]. In die bloed is die halflewe van die mitochondriale ensiem ook korter as dié afkomstig vanaf die sitoplasma [35, 36].

Daar is ook verdere bewyse dat nie een van hierdie komponente homogeen is nie. Veelvoudige vorms van die anioniese ensiem is elektroforeties in menslike serum [37, 38], asook in rot weefsel en vark en menslike hartweefsel [39, 40] opgespoor. Michuda en Martinez-Carrison [41] het ook drie elektroforeties verskillende fraksies vanuit die hart mitochondriale ensiem geskei.

Rej [42] het onlangs (1981) met behulp van ensiem berei uit menslike lewer, aangetoon dat die sitoplasmiese AST (s. AST) vyf subvorms, met isoelektriese punte 5,15; 5,30; 5,45; 5,60 en 5,80, toon, waarvan die immunochemiese en kinetiese eienskappe, identies is. Al die vorms was teenwoordig in vars weefsel, maar met hitte behandeling het die verhouding van die suur vorms verhoog. Veelvoudige molekulêre vorms met dieselfde eienskappe is ook gevind vir die ensiem berei uit die menslike eritrosiet. Hierdie bevindings is in ooreenstemming met die deaminering van aspartiel en glutamiel residu's, as die oorsprong van die veelvuldige vorms. Rej het verder die menslike mitochondriale AST (m. AST) aangetoon as 'n enkele molekulêre vorm met 'n isoelektriese punt van 9.7.

Verskillende faktore kan verantwoordelik wees vir die vorming van hierdie veelvuldige molekulêre vorms van s-AST nl.

- die oksidasie van die sulfhidriël groepe [43]
- die deaminering van aspartiel en glutamiel residu's [40, 44, 45]
- 'n konformasie verandering van die proteïen [46]
- verskille in PLP binding [47] en
- koolstof mikroheterogeniteit [48, 49, 50]

Die veelvuldige s.AST vorms mag dan ook die oorsaak wees van verslae van 'n derde isoensiem van AST in menslike serum. Al Mudhaffar en Al Salihi [51] het m.b.v. kolom chromatografie, drie isoensieme (I en II elueer met fosfaatbuffer en III met natriumkloried) met verskillende K_m en K waardes gekry, soos in Tabel 1.2 aangetoon word.

Tabel 1.2

Bepaling van K en K_m (aspartaat en α -ketoglutaraat) vir die serum ensiem en isoensieme I, II en III

Ensiem	Substraat	K_m (mM)	K (mM)
	Aspartaat		
Serum AST	α -ketoglutaraat	10,3 \pm 0,2	0,44 \pm 0,03
Isoensiem I	"	9,0 \pm 0,1	0,62 \pm 0,03
Isoensiem II	"	2,2 $\times 10^6$	0,363
Isoensiem III	"	3,2 $\times 10^8$	0,58

1.2.5 *AST se kliniese betekenis*

1.2.5.1 Normale variasie

Variasie van AST aktiwiteit met geslag [52] en vasttoestand [53] is aanvanklik waargeneem, maar later is bewys dat hierdie variasie nie betekenisvol is nie [54]. Daar word algemeen aanvaar dat vir kliniese doeleindes, daar geen noemenswaardige variasie met vasttoestand, oefening, ouderdom, geslag of swangerskap, in serum voorkom nie.

1.2.5.2 Kliniese variasie

Die diagnostiese waarde van serum AST aktiwiteit is in 1955 besef toe Karmen et al [55] 'n verhoging in AST aktiwiteit in die sera van pasiënte met verskeie kliniese diagnoses, aangetoon het. Die volgende kriteria word gebruik vir die onderskeiding van verskillende siektetoestande:

- Met 'n miokardiale infarksie begin die serum AST vlakke 4-6 uur na die infarksie styg en bereik dit na 24-36 uur piekhoogtes. Vlakke van 10-15 keer die normale waardes kom voor en die mate waarin dit toeneem, is gewoonlik eweredig met die hartskade [13].
- By virus hepatitis en ander lewersiektes geassosieerd met 'n mate van hepatiese nekrose, mag die vlakke verhoog wees, selfs voor die kliniese tekens (geelsug) voorkom en gedurende die verloop van die toestand kan dit tot 100 keer die normale vlakke styg [13].
- By parengimale lewersiektes kan piek waardes op die sewende tot twaalfde dag voorkom, waarna die aktiwiteit geleidelik afneem en weer na die derde tot vyfde week, normale vlakke bereik [13].
- AST aktiwiteite gesien by sirrose pasiënte, varieer met die staat van die sirrotiese proses vanaf die bogrens van normaal tot 4-5 maal die normale waardes [13].
- AST aktiwiteit neem ook toe by progressiewe spierdistrofie en dermatomiositis (tot 8xN) maar is normaal in ander tipes spiersiektes. Aanvanklik is gedink dat slegs die sitoplasmiese fraksie tydens die Duchene spierdistrofie verhoog [17] maar Matsuda et al [56] het bewys dat daar 'n toename in beide die fraksies voorkom.

- Effense verhoging kan ook gesien word met akute pankreatitis, ongelukspierbeserings, gangreen en hemolitiese siektes [13].

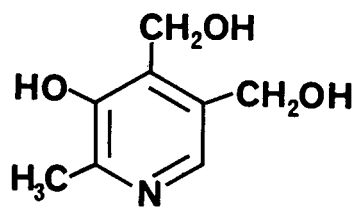
1.3 Vitamien B₆

Sedert 1966 [57] reeds, is dit bekend dat PLP, die koensiem vir AST by die inkubasie media gevoeg moet word om die volle aktiwiteit in die sera te ontwikkel.

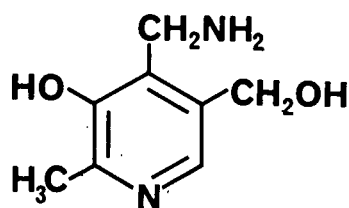
1.3.1 *As vitamien (Gesiedenis)*

In 1934 is 'n faktor waargeneem, wat velletsels in die rot, voorkom. György [58] het aan hierdie faktor die naam, vitamien B₆ toegeken. Die kristallyne verbinding is in 1938 deur drie onafhanklike navorsers [58] geïsoleer, waarna dit gekarakteriseer en sinteties berei is. Bakteriële studies, het later die bestaan van twee ander natuurlike vorme van die vitamien naamlik piridoksaal en piridoksamien [58, 59] aangetoon wat struktureel naverwant aan piridoksien is. Hierdie drie vorme staan saam bekend as vitamien B₆.

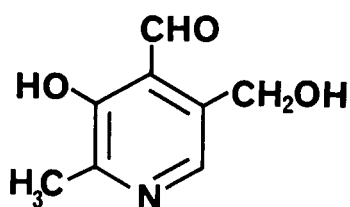
1.3.2 *Strukture*



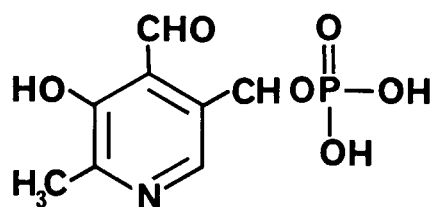
Piridoksien



Piridoksamien



Piridoksaal



Piridoksaalfosfaat

1.3.3 *Verspreiding en liggaamsbenodighede*

Vitamien B₆ kom wyd verspreid in voedsel voor met vleis, graansoorte, neute, eiergeel en sommige vrugte en groente as rykste bron daarvan. In diere produkte kom dit hoofsaaklik in die vorm van piridoksaal en piridoksamien voor, terwyl groentesoorte hoofsaaklik piridoksaal bevat.

Vitamien B₆ word deur alle diere insluitende baie mikroorganismes benodig. Die hoeveelheid vitamien B₆ nodig in die dieet, is rofweg eweredig aan die proteïen inhoud van die dieet. Vir 'n \pm 100 mg proteïen per dag, dieet, word 'n vitamien B₆ inname van 1,8 - 2,2 mg per dag vir die mens aanbeveel [58]. Hierdie vereistes neem toe met swangerskap, laktasie en ouderdom. Simptome van tekort in die mens is skaars, selfs by mense wat minder as die aanbevole hoeveelheid per dag inneem. Daar is egter sekere gevalle waar vitamien B₆ tekort duidelik sigbaar is, nl.

- By pasgebore babas ontwikkel simptome van hiperprikkelbaarheid en konvulsies met 'n lae vitamien B₆ inname [60].

- Die middel, isoniazied, wat gebruik word in die behandeling van tuberkulose, reageer met piridoksaal en piridoksaal fosfaat (PLP) om 'n hidrazoon derivaat te vorm. Daardeur word PLP bevattende ensieme geïnhibeer. Hierdie pasiënte ontwikkel dan periferele neuropatie en hulle repondeer wel op vitamien B₆ toediening [60].

- Die middel penicillamien reageer met PLP om die onaktiewe thirazolidien derivaat te vorm [60]. Hierdie middel word gebruik in die behandeling van pasiënte met Wilson se siekte, cystinurie en artritis.

1.3.4 *Rol as koensiem in verskeie reaksies in die liggaam.*

Al die vorms word geredelik deur die liggaam omgeskakel na piridoksaal-5'-fosfaat, wat biologies aktief is. Meer as

vyftig reaksies in die liggaam is afhanklik van PLP. Dit word onder andere benodig vir die sintese, katabolisme en omskakeling van aminosure [60] asook die absorpsie van aminosure uit die dunderm in die sirkulasie, en die opname van aminosure deur die selle in die algemeen [61].

Verder word dit ook benodig vir die sintese van die neurotransmitters, serotonien en norepinefrien en is dit ook nodig vir die sintese van sphingolipiede. PLP is 'n essensiele komponent van die ensiem glikogeenfosforilase, deurdat dit kovalent bind aan 'n lisien residu en die ensiem stabiliseer. Dit tree ook op as 'n kofaktor vir die omskakeling van triptofaan na NAD [60]. Onlangs is ook gevind dat PLP 'n effek op plaatjie funksie het deurdat dit adenosien difosfaat-geïnduseerde plaatjie vormverandering en aggre gasie inhibeer [62, 63].

Vitamien B₆ het dus meer as een effek in die liggaam, wat die metabolisme, moontlike stoormeganismes en metodes vir die bepaling van vitamien B₆ tekort, 'n belangrike punt van ondersoek maak.

1.4 AST se verband met PLP in kliniese diagnoses

1.4.1 *AST aktivering in verskillende kliniese toestande.*

Aanvanklik kon geen verandering in AST aktiwiteit waargeneem word, na inkubasie met PLP in die reaksiemengsel nie [55, 64, 65]. Dit was waarskynlik te wyte aan kort preinkubasie tye of 'n oordosis PLP, soos bewys deur Holzer en Schreiber [66]. Hamfelt het egter in 1966 aangetoon dat serum AST aktiwiteit wel toeneem na byvoeging van PLP by die bepalingmedium [57]. Hierdie toename varieer met ouderdom en gesondheidstoestand en kom nie slegs by pasiënte met 'n vitamien B₆ tekort voor nie.

Rej et al [67] het in 1973 die stimulasie van AST aktiwiteit gekorrelleer met die pasiënt se diagnose of behandeling en

gevind dat 'n hoër persentasie styging voorkom by pasiënte wat hemodialise ondergaan, as by dié met lewerkarsinoom [67].

Rosalki en Bayoumi [68] het gevind dat as AST aktiwiteit in die serum verhoog is, PLP byvoeging 'n meer uitgesproke verhoging van AST aktiwiteit in sera van post miokardiale infarksie pasiënte toon as by die sera van pasiënte met lewersiektes [69]. Dit was 'n onverwagse bevinding aangesien daar by kroniese alkoholiste 'n hoër graad van vitamien tekort voorkom a.g.v. wanvoeding wat daarmee gepaard gaan. Aanvanklik is gedink dat die verskil in stimulasie die gevolg kan wees van 'n verskil in isoensiem samestelling van die monsters, aangesien die mitochondriale isoensiem gewoonlik meer voorkom na 'n miokardiale infarksie as met lewersiektes [68], maar dit kon nie bewys word nie. Hierdie bevinding is in ooreenstemming met dié van Ratnaike en Moss [70]. Hulle het vasgestel dat daar 'n relatiewe klein verskil in aktivering van AST aktiwiteit tussen s.AST en m.AST voorkom en dat die verskil in die graad van aktivering, nie genoeg is om die verskil in die aktiwiteit van serum, van hart of lewersiektes, te verklaar nie. Rosalki en Bayoumi [68] het ook gevind dat die normale serum ensiem, en die verhoogde ensiemvlakke teenwoordig in die serum met kroniese toestande, feitlik versadig is met sirkulerende PLP. 'n Skielike uitvloei van AST uit die weefsel na die sirkulasie bring die vrystelling van onversadigde ensiem teweeg. Aangesien daar dan 'n onvoldoende koensiem (PLP) konsentrasie in die serum teenwoordig is, word 'n groter persentasie aktivering van ensiemaktiwiteit veroorsaak, deur die byvoeging van PLP [68]. Die verskil in persentasie aktivering van die AST aktiwiteit by verskillende siektetoestande, kan ook dui op 'n groter verlies van koensiem gedurende die vrystelling van holo-AST vanuit sommige weefsel en vergelyking met ander weefsel [70]. De Waal et al [71] het egter voorgestel dat die tipe besering van 'n orgaan, die graad van aktivering van AST deur PLP, kan bepaal, sodat dit nie noodwendig die orgaan betrokke,

byvoorbeeld die lewer of hart is, wat vir die verskil in aktivering verantwoordelik is nie.

'n Merkwaardige stimulasie van AST aktiwiteit is ook aangetoon in pasiënte na kardiaale chirurgie [69, 72]. Moss [69] het hierdie toename toegeskryf aan die vrystelling van ensieme vanaf die skeletspiere a.g.v. onvoldoende oksigenasie van die weefsel tydens ekstrakorporeale sirkulasie [73]. Aangesien die apo:holoensiem verhouding ooreengestem het met dié in normale serum, het hy voorgestel dat AST normaalweg teenwoordig in die serum, afkomstig mag wees vanaf die spiere.

Cheung en Briggs [72] het by 135 plasma monsters, van pasiënte met verskillende patologiese toestande 'n gemiddelde aktivering van AST aktiwiteit van 37 %, met 'n variasie vanaf 0 % tot 389 % gevind. Drie diabetes pasiënte wat in die hospitaal opgeneem is, sodat hul glukose konsentrasie kon stabiliseer, het 'n konstante daling in die persentasie aktivering van AST aktiwiteit getoon. Die vierde diabetes pasiënt se AST waarde het egter konstant gebly, maar hy het 'n ongeëelde fluktuasie in glukose konsentrasie getoon.

Kamei [74] het gevind dat mitochondriale AST langer as sitoplasmiese AST met PLP geïnkubeer moet word vir maksimum aktiwiteit a.g.v. die lae affiniteit van die mitochondriale AST aan PLP [75]. Kamei het ook gevind dat in gevalle van snelverlopende hepatitis, veroorsaak deur lewerskade a.g.v. akute sirkulatoriese versteurings, 'n groter hoeveelheid mitochondriale AST as gewoonlik vrygestel word. Daar kom ook groter fluktuasies van die apoensiem en holoensiem verhouding van dag tot dag voor by pasiënte met akute hepatitis selfs met 'n konstante vitamien B₆ aanvulling. Hy stel dan voor dat hierdie fluktuasies kan voorkom a.g.v. verskillende meganismes van ontwrigting van:

- Vitamien B₆ voorsiening aan die betrokke lewersel.
- die metaboliese pad vanaf piridoksien via piridoksien fosfaat na piridoksaal fosfaat.
- die binding van PLP aan die AST isoensieme in die lewersel.

Met die vrystelling van AST uit beskadigde weefsel, is daar dus verskillende stimulasie patrone van die ensiem. As gevolg van hierdie feit het die IFKC aanbeveel [8] dat PLP tydens die roetine bepaling van AST in die chemiese laboratorium by die inkubasie-medium gevoeg moet word. Met die modernisering van ensiemanaliseerders, die hoë premie op geld en tyd en die variasie in die gedrag van AST aktiwiteit met en sonder die byvoeging van PLP tot die inkubasiemedium, het dit dus dringend noodsaaklik geword om 'n gestandaardiseerde metode vir die bepaling van die ensiem, op die nuwe meer outomatiese ensiemanaliseerders, uit te werk. Die eerste doel van hierdie ondersoek was om so 'n goedkoop, tydbesparende metode op die outomatiese Gilford 3500 sisteem, te ontwikkel.

1.4.2 *Bepaling van AST aktiwiteit as aanduiding van vitamien B₆ status in die liggaam.*

Rej en Vanderlinde [76] het beweer dat die verspreiding van AST verwysingswaardes kleiner mag wees, indien serum AST aktiwiteit, na die byvoeging van PLP, bepaal word. Horder en Bowers [77] het 'n intra individuele variasie koëfisiente (V) van 5,3 voor en 5,1 na, en 'n interindividuele V van 13,2 voor en 13,6 na die byvoeging van PLP gekry. Ratnaïke en Moss [70] het egter 'n variasie in die persentasie aktivering van AST aktiwiteit van 0-100 % gevind by sera van gesonde welgevoede volwasse mense.

Bayoumi en Rosalki [78] het voorgestel dat plasma vitamien B₆ konsentrasie, eerder die onlangse inname, as die weefselstore voorstel. Eritrosiete is maklik bekombare weefsel en hoewel vitamien B₆ nie maklik direk daarin bepaal kan word nie, kan indirek van AST, wat vitamien B₆ as koensiem benodig vir ensiemaktiwiteit, gebruik gemaak word.

'n Omkeerbare verwantskap tussen die aktivering van AST aktiwiteit deur PLP is deur Raica en Sauberlich [5] gevind en Hamlett [79] het hierdie aktivering met eritrosiet vitamien konsentrasie gekorreleer.

Bayoumi en Rosalki [78] het by gesonde persone op 'n normale dieet 'n aktivering van AST aktiwiteit in die eritrosiet deur PLP van 130 % gevind. Dit was hoër as dié geraporteer deur Nobbs [80] wat 25 % en Hoorn et al [81.] wat 86 % aktivering gekry het. Hulle verklaar egter hierdie verskil deurdat hulle van optimale bepaling prosedures gebruik gemaak het. Hoewel orale toediening van vitamien B₆ aanvullings 'n afname in die persentasie aktivering te weeg gebring het, beweer hulle dat hierdie laer aktiverings nie as verwysingswaardes beskou moet word nie, aangesien dit impliseer dat 'n normale dieet nie voldoende hoeveelhede vitamien B₆ bevat nie.

Die vraag ontstaan ook of dit wel vir die volwasse eritrosiet nodig is, dat AST ten volle versadig moet wees met PLP vir maksimale ensiemaktiwiteit, aangesien daar by hierdie normale mense waarby daar wel ook 'n aktivering van AST aktiwiteit voorkom, geen kliniese tekens van vitamien B₆ tekort waargeneem kon word nie. Die funksie van AST in die volwasse eritrosiet is ook nie heeltemal duidelik nie, aangesien daar geen mitochondria in die genoemde bloedliggaampie teenwoordig is nie.

Daar is voorgestel dat abnormale aktivering van AST aktiwiteit, eerder as maatstaf gebruik moet word. Sulke abnormale variasies van AST aktivering is waargeneem by vroue met die gebruik van orale voorbehoedmiddels [82, 83] en by epileptiese pasiënte op antikonvulsie terapie [84]. Verhoogde aktivering is ook waargeneem by pasiënte met ouderdomskwale wat vergelyk is met 'n kontrole groep. Hierdie pasiënte het wel gereageer op orale innames van vitamien B₆ [81]. Weereens ontstaan die vraag of die aktivering van AST aktiwiteit in hierdie persone werklik 'n aanduiding van die intrasellulêre PLP konsentrasie is.

Fischer en Watter [85] het ook gevind dat AST aktiwiteit in jong eritrosiete hoër en die aktivering met PLP laer is as

in ou eritrosiete. Daaruit is afgelei dat die AST in ou eritrosiete in drie groepe verdeel kan word naamlik aktiewe AST, onaktiewe AST wat weer geaktiveer kan word deur die byvoeging van PLP, en AST wat permanent onaktief is.

Dit is dus duidelik dat die 'CAS' beginsel toegepas op serum en hemolisaat AST vir die bepaling van die PLP status van die liggaam bevraagteken kan word. In die derde afdeling van hierdie werk, is die invloed van orale PLP toediening op die aktivering van AST aktiwiteit op verskillende gefraksioneerde eritrosiet fraksies, sowel as op plasma, ondersoek.

1.5 Metabolisme van vitamien B₆ in die liggaam.

Soos dit blyk uit die voorafgaande literatuurstudie is eritrosiet AST om 'n onverklaarbare rede onversadig en is dit nodig om te kyk na die metabolisme van die koensiem vir AST. Hoewel die funksie van vitamien B₆ as koensiem reeds deur verskeie navorsers ondersoek is, is daar min bekend oor die metabolisme van die verskillende vorms van die vitamien in vivo. Aanvanklik is veral die lewersel as model gebruik om die verskillende aspekte van vitamien B₆ metabolisme soos, opname deur die sel asook beheer van dié opname, die omskakeling na die aktiewe vorme, die betrokkenheid van die mitochondria, asook die moontlik stoormeganismes te ondersoek. Later is daar ook gevind dat die eritrosiet 'n belangrike rol in die metabolisme van vitamien B₆ speel.

1.5.1 *Vitamien B₆ metabolisme in die lewer*

1.5.1.1. Ensieme betrokke

Johansson et al [86] het in 1974 op grond van gepubliseerde resultate voorgestel dat die omskakeling van piridoksien (PN) na piridoksaal-5'-fosfaat (PLP) op twee maniere kan plaasvind nl.

i Piridoksien**Piridoksaal****Piridoksaal-5'-fosfaat****ii Piridoksien****Piridoksienfosfaat****Piridoksaal-5'-fosfaat**

Studies met gedeeltelik gesuiwerde piridoksien dehidrogenase het 'n ewewig in die guns van die vorming van piridoksien in reaksie (i) getoon [87]. Met behulp van radioaktief gemerkte PN is gevind dat daar in vivo 'n vinnige omskakeling van PN na PLP voorkom [86]. Dit dui daarop dat die hoof omskakeling na PLP op die gefosforileerde vlak plaasvind, dus deur reaksie (ii) eerder as (i). In die lewer van eksperimentele konyne kon net 'n klein hoeveelheid gemerkte PN en piridoksaal (PL) waargeneem word, maar in die karkas van die diere, het

betekenisvolle hoeveelhede van hierdie bestandele verskyn, veral na die eerste uur van toediening daarvan aan die konyne. Aangesien die ongefosforileerde vorme van vitamien B₆ makliker oor die selmembraan getranspoteer kan word, is dit dus moontlik dat PL, gevorm deur die aksie van fosfatases op PLP, vervoer word na ander organe en daar weer gefosforileer word [86].

Vroeër is ook aangeneem dat vitamien B₆ deur die vorming van 4-piridoksiensuur vanaf PL, 'n reaksie gekataliseer deur die ensiem aldehydoksidase, afgebreek word [88]. Contractor en Shane [89] het egter beweer dat 4-piridoksiensuur-5'-fosfaat die normale metaboliet van PLP is. Wei et al [90] het egter hierdie bevinding van Contractor en Shane aangetoon as 'n artefak, geproduseer deur die invloed van lig. In 1976 het Stanulovic et al [91] gevind dat 'n NAD⁺ afhanklike aldehyd dehidrogenase ook die vorming van 4-piridoksiensuur kataliseer.

1.5.1.2 Effek van 'n Vitamien B₆ tekort

Tryfiates en Saus [92] het 'n vitamien B₆ tekort in rotte geïnduseer en die rotte daarna intraperitoniaal met tritium gemerkte piridoksienhidrochloried ingespuut. In vergelyking met die kontrole diere was daar 'n verlengde opname van die merker deur die lewer by die vitamien B₆ tekort diere. By die vitamien B₆ tekort diere was daar ook 'n twee maal groter opname van die merker, asook 'n langer terughouding van die merker, van sewe dae, in vergelyking met die drie uur by kontrole diere, na maksimale opname van die merker deur die lewer. Die metaboliese interomskakeling van die getritieerde PN was ook baie vinniger by die vitamien B₆ tekort diere, hoewel die volgorde van die verskyning van die vitamien B₆ verbindings dieselfde was as by kontrole diere [86, 92, 93, 94]. Na maksimale PLP sintese was daar 'n liniere omskakeling na piridoksamien fosfaat (PMP) tot 'n ewewig tussen die twee derivate in 'n verhouding van 2:1 met PMP as die hoofkomponent, bereik is. Hierdie PMP is nie verder verbruik of gemetaboliseer nie [92]. Die omgekeerde is gevind in die lewer van normale kontrole diere [93].

By die kontrole diere is 'n hoë piridoksaalkinase vlak gevind. Dit dui moontlik op die noodsaaklikheid vir die diere om beskikbare PN uit die dieet, om te skakel in 'n bruikbare gefosforileerde, vorm. By vitamien B₆ tekort diere is 'n hoë piridoksienfosfaatoksidase vlak gevind. Dit kan weer dui op produkinhibisie in vivo onder normale omstandighede [92]. Daar word ook voorgestel dat indien dieet PN nie verskaf word nie, die diere PLP, so vinnig as wat ensiemgebonde PMP gevorm word gedurende die ensiematiese transaminase, weer regeneer sodat die PLP weer beskikbaar kan wees vir die reaksie.

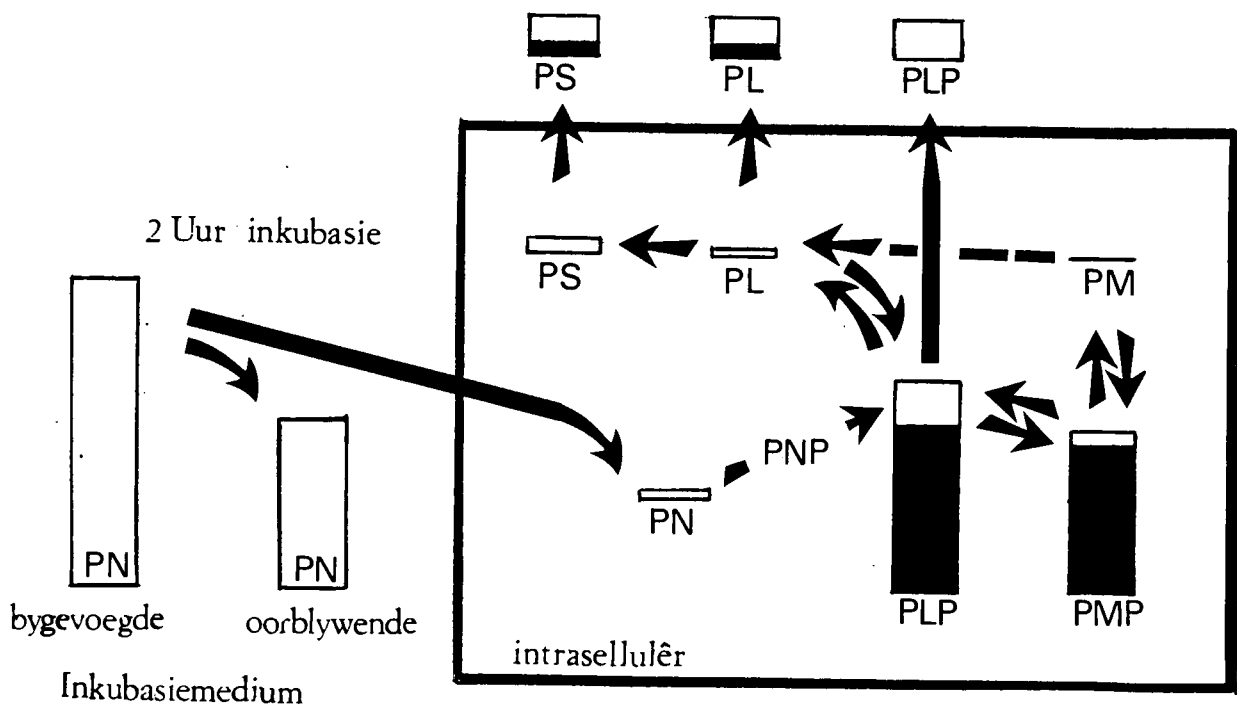
1.5.1.3 Effek van 'n vitamien B₆ oormaat.

Lumeng et al [95] het die effek van PN aanvulling, op die plasma inhoud van die derivate en piridoksiensuur, asook die metaboliese omskakeling en vrystelling van die vitamien B₆ verbindings, in geïsoleerde rot hepatosiete, ondersoek. Hul bevindings stem ooreen met Snell en Haskell [87] en kan as volg saamgevat word:

Fig 1.3

Die skematiese voorstelling van die metaboliese omskakeling van PN deur geïsoleerde rot hepatosiete. (Lumeng et al (95))

Wit areas: radioaktiefgemerkte PN en die gemerkte metaboliese produkte
Donker areas: endogene PLP en PMP.



- (i) PLP en PMP is die hoof endogene vitamien B₆ verbindings in lewerselle [95, 96, 97] en hul intrasellulêre hoeveelhede word streng gereguleer sodat 'n oormaat nie in die teenwoordigheid van nie-gefosforileerde voorlopers akkumuleer nie.
- (ii) Nuut gesintetiseerde PLP en PMP, vermeng nie vrylik met die endogene intrasellulêre poele van die koensiem nie en verteenwoordig 'n vinnig mobiliseerbare vitamien B₆ poel in die lewer. PLP wat in oormaat gesintetiseer word, word of vrygestel in die inkubasiemedium of gedegradeer tot piridoksaal (PL) en piridoksiensuur (PS).
- (iii) Die hoof vitamien B₆ verbindings wat deur die lewer vrygestel word, is PLP, PL en PS, maar nie PNP nie [95].

1.5.1.4 Beheer van vitamien B₆ metabolisme in die lewersel.

Met 'n dieet inname van 25-50 µg PN per dag, het die vitamien vlak in rotlewer toegeneem, maar daarna onveranderd gebly met enige verdere dieet toenames [98, 99]. Met 'n baie hoë PN inname, is daar verder ook 'n afname in die totale vitamien B₆ konsentrasie asook 'n statisties betekenisvolle afname in PLP en PMP konsentrasies gevind [97]. Die feit dat hoër dieet innames nie lei tot hoër konsentrasies in die weefsel nie, dui op 'n regulatoriese meganisme in vivo. Brown en Reynolds [100] en Turner [101] het voorgestel dat, piridoksienfosfaat-oksidasie (PNP oksidasie) deur die meganisme van produk-inhibisie [87], of verskeie sellulêre fosfatases deur hidrolise, kan optree as reguleerders van die weefselvlak van PLP.

Li en medewerkers [102] het ook die regulering van PLP metabolisme in rotlewer en geïsoleerde rot hepatosiete ondersoek.

Hulle het aan gespeende mannetjie Spraque Dowley rotte 'n PN dieet van 'n 0,33; 3,6 en 36 keer die daaglikse benodighede [103] gegee. Hierdie groot verskille het, na 'n aanvanklike toename, geen betekenisvolle verskil in die PLP vlak in die lewer en brein veroorsaak nie [102].

Die inhibering van fosfatase aktiwiteit deur die byvoeging van 80 mM fosfaat, het 'n verhoging in PLP konsentrasie, na inkubasie van die hepatosiete met 'n toenemende PN konsentrasie tot met 50 μ M veroorsaak [102]. Dit lyk dus of hidrolise van 'n oormaat PLP ook 'n fisiologies belangrike beheer faktor, in die regulering van sellulêre inhoud van PLP is.

Die rol van PNP oksidase in die beheer van PLP sintese is deur Li en medewerkers [102] in die lewer sitosol ondersoek. Hulle het gevind dat die PLP konsentrasie vinnig gestyg het na die byvoeging van adenosien trifosfaat (ATP) en PN by die sitosol, selfs nadat 50 μ M PLP by die inkubasie medium gevoeg is. Dit skakel die regulering van PLP sintese deur produkinhibisie uit as die enigste beheer meganisme. Die gebrek aan produkinhibisie kan deels toegeskryf word aan die binding van PLP aan proteïne in die sitosol sodat die konsentrasie van vry PLP laag bly. Dit is dan ook bevestig deurdat slegs 50 % van die PLP uit die sitosol verwyder kon word met behulp van dialise. Die oorblywende PLP was ook bestand teen hidrolise deur fosfatase aktiwiteit van lewer- en plasma- membraan bereiding [102].

Beide in vivo en in vitro studies [93, 94, 104, 105] het getoon dat daar geen produkinhibisie van piridoksaalkinase voorkom nie en dat piridoksaalkinase die sellulêre vitamien B₆ verbindings primêr in die gefosforileerde vorms hou.

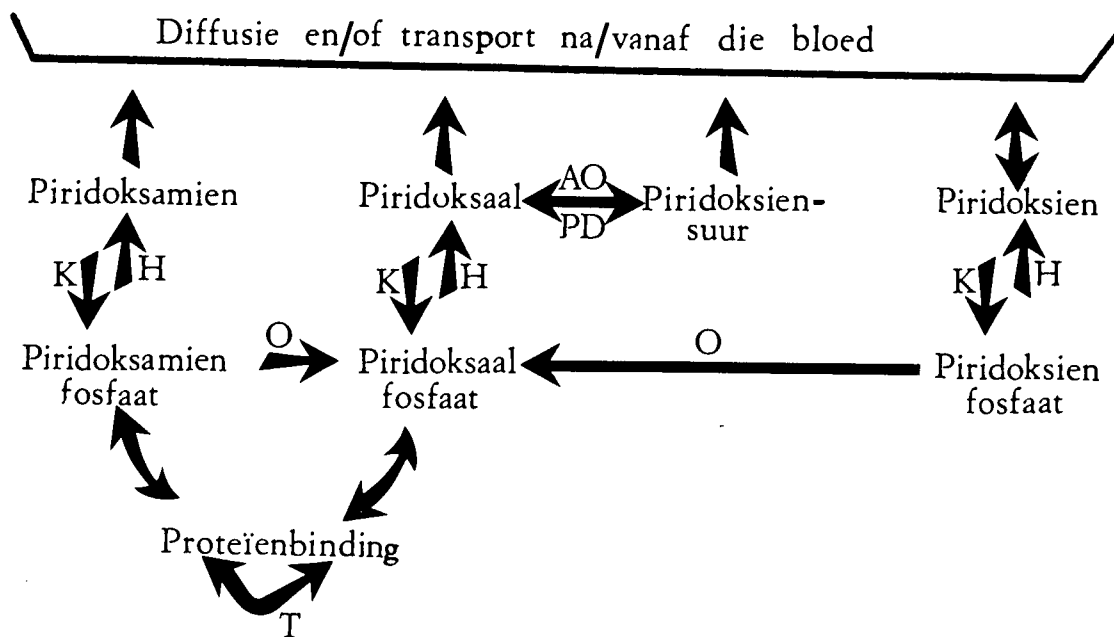
Onlangs is die kapasiteit van rotlewermitochondria om vitamien B₆ te metaboliseer ook deur Lui et al [106] ondersoek, aangesien heelwat vitamien B₆ afhanklike reaksies daarin plaasvind. Twintig persent van die vitamien B₆ inhoud

in die lewer van rotte op 'n voldoende vitamien B₆ dieet, is in die mitochondria gelokaliseer. PLP (PMP) hidrolase aktiwiteit is ook in die intramembraan spasie van geïsoleerde mitochondria aangetoon. Geen PL kinase aktiwiteit en minder as 5 % van die PNP oksidase aktiwiteit teenwoordig in die sitosol, is in die mitochondria gevind. PLP of PMP kan dus nie vanaf PN, PL of PNP in die mitochondria gesintetiseer word nie.

In eksperimente waarin geïsoleerde hepatosiete met [¹⁴C] PN geïnkubeer is, is PLP in die sitosol gesintetiseer, waarna dit teen 'n liniêre tempo deur die mitochondria opgeneem is. Die nuut gesintetiseerde PLP poel is by voorkeur deur die mitochondria opgeneem, of deur die hepatosiete gesekreter en gedegradeer [106].

Opgesom kan vitamien B₆ metabolisme in die lewersel as volg voorgestel word:

Fig 1.4



AO: Aldehydoksidase
H : Alkaliese fosfatase
K : Piridoksaalkinase

O : Piridoksienfosfaatoksidase
PD: Piridoksaaldehydogenase
T : Transaminase

1.5.2 *Vitamiën B₆ metabolisme in die eritrosiet*

Die moontlike rol van die sirkulerende eritrosiet in die metabolisme van vitamien B₆ is reeds in 1967 deur Hamfelt [107] en Yamanda and Tsuji [108] in 1968 voorgestel en deur Anderson en medewerkers in 1970 [109] bevestig. Barbara Anderson en medewerkers [9] het veral deeglik na die in vivo en in vitro situasie gekyk.

Die verskyning van PL en PLP in die bloed, op verskillende tydsintervalle na 'n orale PN toediening, is bepaal. PL en PLP, na hidrolisering, is met behulp van Lactobacillus casei N CIP 8010 (ATCC 7469) aktiwiteit gemeet. Hulle het gevind dat PN in vivo vinnig opgeneem word sodat daar reeds na 10 minute 'n verhoogde L.casei aktiwiteit in die eritrosiet aangetoon kon word. Die aktiwiteit het vinnig toegeneem tot 'n piek na een uur en 'n tweede piek na twee ure. L.casei aktiwiteit het ook na 20 minute in die plasma begin verskyn en geleidelik gestyg tot 'n plato tussen 1 en 2 ure, waarna dit gedaal het. Die akkumulering van L.casei aktiwiteit in die eritrosiet stel dus voor dat die omskakeling van PN daar plaasvind. Verder is beide PL en PLP in die eritrosiet gevind, maar slegs PL, in die plasma.

Die in vitro situasie was baie dieselfde. Met die inkubasie van PN met heelbloed (500 ng/ml) is 7 % van die PN reeds na 1 minuut en 95 % na 60 minute, omskakel na PLP in die eritrosiet. Aanvanklik was PLP die hoofvorm teenwoordig in die eritrosiet, maar na 40 minute het die PL konsentrasie geleidelik toegeneem en die PLP konsentrasie, afgeneem. Omskakeling van PN na PLP, het aanvanklik ook stadiger plaasgevind as die opname van PN deur die eritrosiet. Veertig persent van die PN is reeds na 1 minuut opgeneem maar slegs 7 % daarvan is omskakel na PLP terwyl al die PN opgeneem na 40 minute ook omskakel was.

Geringe L.casei aktiwiteit is na vyf minute in die plasma waargeneem. Dit het geleidelik toegeneem totdat 'n plato van 35 % na 90 minute bereik is. Dit impliseer dat 'n gedeelte van die aktiwiteit, gevorm in die eritrosiet, geleidelik in die plasma vrygestel word. PN geïnkubeer met plasma alleen het geen L.casei aktiwiteit getoon nie [9].

Waar piridoksamien (PM) met heelbloed geïnkubeer is, was daar 'n toename in die PL en PLP konsentrasies in die eritrosiete maar slegs 50 % van die PM is na twee ure omgeskakel [9].

Inkubasie van PL met heelbloed (50-2000 ngPL/ml heelbloed) het 'n verspreiding tussen die plasma en eritrosiete, soorgelyk aan die verspreiding in normale heelbloed getoon naamlik 38,8 % in die plasma en 62,5 % in die selle. Waar die plasma egter met isotoniese natriumchloried (NaCl) vervang is, het die meeste PL die eritrosiete binnegegaan. Dit stel 'n faktor in plasma voor wat die terughouding van PL veroorsaak [9].

Tydens die inkubasie van PLP (200-2000 ng/ml) met heelbloed, is al die PLP in die plasma teruggehou. Waar die plasma met isotoniese NaCl vervang is, het die PLP wel die selle binnegegaan en kon slegs 20 % van die PLP in die NaCl aangetoon word, selfs by 'n konsentrasie van 2000 ng per milliliter heelbloed [9].

In teenstelling met PLP lyk dit of PNP wel die eritrosiete binnegaan tydens inkubasies van eritrosiete en saline, sowel as heelbloed, met PNP. Sestig persent van die PNP is reeds binne 'n uur omgeskakel na PL en PLP.

Mehanso en Henderson [110] het verder die vervoer van PN en PL vanaf die plasma na die eritrosiet ondersoek deur gebruik te maak van 'n vinnige vermengingstegniek met tritium

gemerkte substrate. Hulle het gevind dat PN en PL vinnig deur passiewe diffusie opgeneem word deur die eritrosiete, aangesien die aanvanklike invloeiproses onversadigbaar is en nie geaffekteer word deur PM, PL of 4-deoksiepiridoksien (kompetatiewe inhibitore van PN kinase) nie. Die akkumulاسie van tritium gemerkte PN teen 'n konsentrasiegradient, was eerder die gevolg van metaboliese vaskering a.g.v. fosforilasie van PN, as aktiewe transport. Dit is bewys deur die byvoeging van ongemerkte PN, PL en PM. 'n Kinase-onafhanklike akkumulاسie van PL teen 'n konsentrasie gradient in die afwesigheid van bewyse vir gemedieerde transport is ook gevind. Dit suggereer dat binding deur 'n intrasellulêre proteïen vir die akkumulاسie verantwoordelik is en dat PL deur 'n Schiff's basisvorming aan die proteïen bind. Hulle het ook met behulp van Sephadex G-75 gelfiltrاسie aangetoon dat hierdie bindingsproteïen moontlik hemoglobien (Hb) mag wees [110].

Die binding van PLP aan Hb is ook reeds voorheen gerapporteer [111 - 113]. Dit is dus verder moontlik dat PL aan die PLP bindingsloki van Hb bind. Lumeng en Li [114] het aangetoon dat asetaldheid die PLP vlak in menslike eritrosiete verminder deur die hidrolise van PLP te versnel. Dit kan werk deurdat asetaldheid met PLP kompeteer vir bindingsloki op hemoglobien, sodat daar 'n toename in ongebonde PLP voorkom, wat dan maklik deur fosfatases gehidroliseer kan word.

Akkumulاسie van PL teen 'n konsentrasie gradient, is ook deur ander navorsers waargeneem [108, 115] waaruit afgelei is dat dit deur 'n aktiewe proses opgeneem word. Aangesien PL daardeur tot 'n 4 maal hoër konsentrasie in die eritrosiete as plasma bereik, kan PL gebind aan hemoglobien, die hoofbron van die sirkulerende vitamien B₆ wees.

Die vraag ontstaan dus nou, waarom die AST in die eritrosiet in die onaktiewe apoensiem vorm teenwoordig is, terwyl vitamien B₆ wel deur die eritrosiet opgeneem en omgeskakel

kan word na die aktiewe vitamien. In die tweede deel van die projek, is die probleem aangepak deur die inkubasie eksperimente van Anderson et al [9] te herhaal en AST as merker van intrasellulêre PLP konsentrasie te gebruik in plaas van radioaktief gemerkte vitamien B₆ derivate.

In die lig van die voorafgaande literatuur studie, is hierdie projek onderneem om inligting te bekom, sodat die mees effektiewe metode, wat aan al die vereistes van die IFKC voldoen, op die outomatiese ensiemanaliseerders ontwikkel kan word vir die bepaling van hemolisaat- en serum AST aktiwiteit in 'n roetine laboratorium. Daar is verder gepoog om te kyk na die metabolisme van vitamien B₆ in die eritrosiet om sodoende vas te stel of AST as merker van PLP status in die eritrosiet gebruik kan word.

Die volgende punte is veral deeglik ondersoek:

1. Daar is gepoog om 'n gestandaardiseerde metode vir die bepaling van AST aktiwiteit op 'n outomatiese analiseerder (Gilford 3500 sisteem) te ontwikkel. Die praktiese probleme betrokke by die inkubasie van AST met PLP tydens die bepalingsprosedures, veral met die oog op 'n geskikte preinkubasietyd, is ondersoek.
2. Na aanleiding van die werk van Anderson et al [9], is die metabolisme van vitamien B₆ in die eritrosiet, met AST as biologiese merker ondersoek, om sodoende vas te stel of die vitamien B₆, opgeneem deur die eritrosiet, en omgeskakel na die aktiewe vorm, PLP, wel beskikbaar gestel word vir aktivering van die onaktiewe AST.
3. Die invloed van orale vitamien B₆ toediening, op die aktivering van AST aktiwiteit in die eritrosiet, asook die toename in totale AST aktiwiteit by normale kontrole persone, is ook ondersoek. Daardeur is die geldigheid van die 'CAS' beginsel vir die bepaling van vitamien B₆ status van die liggaam, getoets.

HOOFSTUK 2

EKSPERIMENTELE PROSEDURES

2.0	Inleiding	32
2.1	Metode vir bepaling van AST	32
2.1.1	Optimum toestande vir die bepaling van AST soos aanbeveel deur die IFKC	32
2.1.1.1	Buffer	33
2.1.1.2	Piridoksaal-5'-fosfaat konsentrasie	33
2.1.1.3	Substrate	34
2.1.1.4	Indikator ensieme	35
2.1.1.5	NADH konsentrasie	35
2.1.2	Eksperimentele prosedures soos gevolg in ons laboratorium	36
2.1.2.1	Bereiding van hemolysate vir AST bepaling	36
2.1.2.2	Chemikalië gebruik vir AST bepaling	36
2.1.2.3	Apparaat gebruik vir bepaling van AST aktiwiteit	36
2.1.2.4	Standaardisering van AST bepalingsmetode vir gebruik op die Gilfordsisteen	42
2.2	Die invloed van verskillende preïnkubasietye op die aktivering van AST aktiwiteit deur PLP	48
2.2.1	Plasma en hemolysaat AST aktiwiteit by kamer- temperatuur sonder die in vitro byvoeging van PLP...49	49
2.2.2	Optimale preïnkubasietyd vir volle aktivering van AST aktiwiteit deur PLP by kamertemperatuur	49
2.2.3	Invloed van hoë en lae PLP konsentrasies op preïnkubasietyd	51
2.2.4	Invloed van temperatuur op preïnkubasietyd	54
2.2.5	Verskille in apoensiemgedrag in normale plasma en in plasma van siek persone	54

2.3	Vasstelling van optimum toestand met bereiding van die monsters vir AST bepaling	57
2.3.1	Proefpersone en monsterverkryging	57
2.3.2	Die invloed van verskillende antistofmiddels op AST aktiwiteit	57
2.3.3	Preïnkubasie van AST met PLP	61
2.3.4	Stabiliteit van AST en PLP verbinding tydens periodes van stoor	63
2.3.4.1	Heelbloed alleen verouder	63
2.3.4.2	Veroudering van gewasde eritrosiete gesuspendeer in 'n voedingsmedium	65
2.3.4.3	Veroudering van gewasde eritrosiete in 'n isotoniese NaCl oplossing	65
2.3.4.4	Veroudering van 'n hemolisaatbereiding in die teenwoordigheid van seldebrie en membrane	68
2.3.4.5	Veroudering van 'n volledig bereide hemolisaat	71

HOOFSTUK 2

EKSPERIMENTELE PROSEDURES

2.0 Inleiding

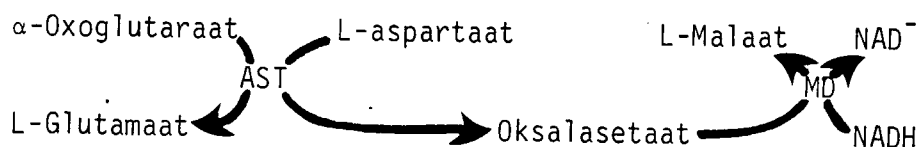
Die aktiwiteit van Aspartaataminotransferase (AST) in die plasma, word op 'n roetine basis in die chemiese laboratorium bepaal vir die diagnose van verskeie siektetoestande, soos miokardiale infarkties en lewersiektes. Die ensiem benodig die vitamien, piridoksaal-5-fosfaat (PLP) as koensiem vir sy katalitiese aktiwiteit. In die plasma van normale mense sowel as by genoemde kliniese toestande, kom die ensiem in beide die apoensiem sowel as holoensiemvorm voor en is dit reeds voorgestel dat PLP op 'n roetine basis by hierdie bepaling-medium gevoeg moet word sodat totale AST aktiwiteit deurgaans bepaal kan word. Verskeie tegniese probleme ontstaan egter met die byvoeging van PLP by die reaksie-medium, wat daartoe bydra dat nuwe inkubasietye in oorweging geneem moet word.

In hierdie hoofstuk is die verskillende praktiese faktore by die hantering van die monster vir die bepaling van AST aktiwiteit, met en sonder die byvoeging van PLP tot die inkubasiem medium, ondersoek. Die bepalingmetode op 'n outomatiese analiseerder is gestandaardiseer, met die oog op maksimum produktiwiteit, sonder om akkuraatheid en presisie in te boet. Die invloed van die byvoeging van PLP tot die inkubasiem medium, op verskillende monsters, is ook ondersoek, met die doel om 'n geskikte preinkubasietyd vir alle monsters te bepaal.

2.1 Metode vir bepaling van Aspartaataminotransferase

2.1.1⁺ *Optimum toestande vir die bepaling van AST soos aanbeveel deur die Internasionale Federasie van Kliniese Chemie (IFCC).* Die reaksie wat deur AST gekataliseer word behels 'n twee substraat 'Ping-Pong Bi-Bi' meganisme [116, 117] wat as volg voorgestel kan word:

⁺Alle inligting en figure in hierdie afdeling (2.1.1) is verkry uit: Provisional Recommendations: IFCC Method for Aspartate aminotransferase. (1977) Clin Chem 23(5), pp 893-898.



Die verdwyning van NADH word dan spektrofotometries bepaal. Die IFKC het die volgende optimale toestande vir die bepaling van AST beskryf:

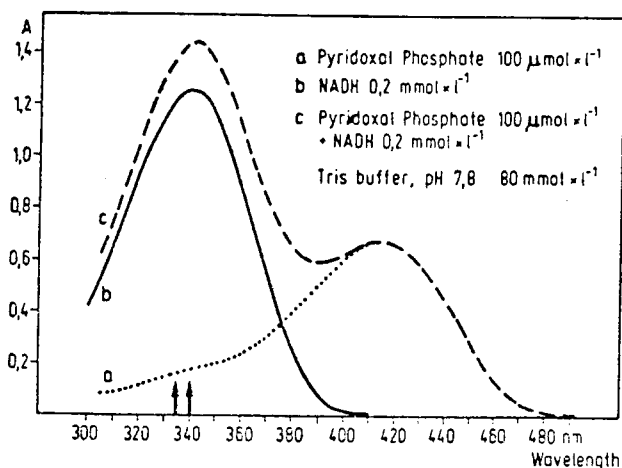
2.1.1.1 Buffer

Die katalitiese aktiwiteit van 'n ensiem en optimale substraat konsentrasie hang af van die soort buffer, ioniese sterkte en pH van die buffer wat gebruik word. Die optimum pH vir AST afkomstig van die lewer en hart, is tussen 7,6 en 8,0 en 'n pH van 7,8 is aanbeveel vir die bepalingsdoeleindes. Aangesien fosfaatione die rekombinasie van apoensiem [76] met PLP, deur kompetiewe binding inhibeer, is gevind dat 'n 80 mM Tris buffer aan al bogenoemde vereistes voldoen en net genoeg is om die pH konstant te hou na byvoeging van die monster en reagens.

2.1.1.2 Piridoksaal-5-fosfaat konsentrasie

In Tris buffer, met al die reagense nodig vir die bepaling van AST katalitiese aktiwiteit, is volledige versadiging van die ensiem met sy koensiem PLP binne 10 min verkry by 30°C en 'n PLP konsentrasie van 0,10 mmol/l. By 'n absorpsie van 340nm meng die konsentrasie van PLP nie met die spektrofotometriese bepalingsmetode in nie (Fig 2.1).

Fig 2.1

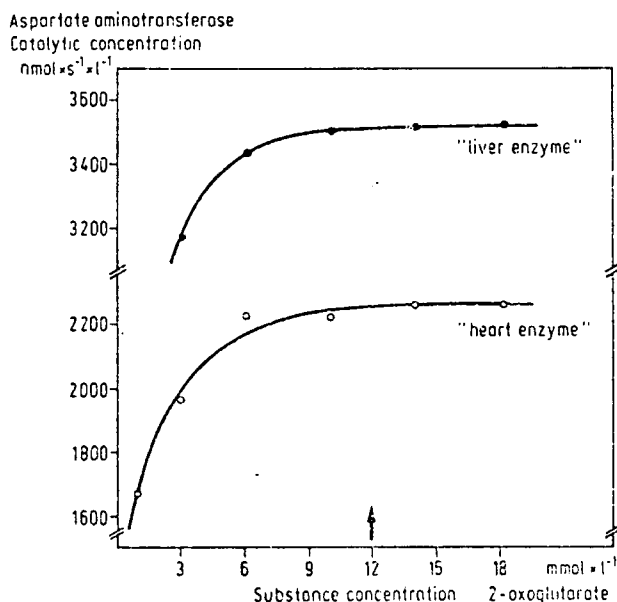


Absorbance spectra of NADH and pyridoxal phosphate in Tris buffer.

2.1.1.3 Substrate

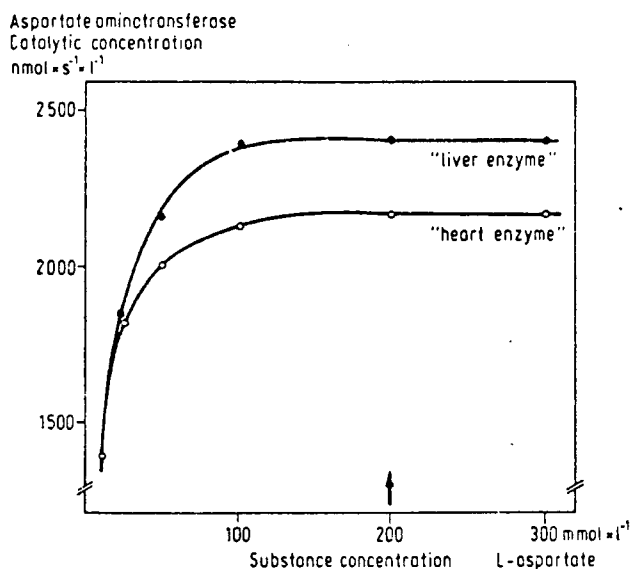
Vir die AST aktiwiteitsbepaling, in die plasma van pasiënte met lewer en hartsiektes, is die optimale substraat konsentrasie van α -oxoglutaraat 10-17 mmol/l (fig. 2.2) en van L-aspartaat 200 mmol/l (fig 2.3) in 'n Tris (hidroksiemetiel) aminmetaan buffer met 'n konsentrasie van 80 mmol/l by 'n pH van 7,8 aanbeveel.

Fig 2.2



Dependence of catalytic concentration of aspartate aminotransferase on concentration of 2-oxoglutarate. The sources of enzyme were pools of human sera from patients with heart and liver diseases ("heart enzyme" and "liver enzyme"). Conditions of measurement: Tris buffer, pH = 7,8, 80 $\text{nmol} \times \text{l}^{-1}$; pyridoxal phosphate 100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$; L-aspartate 200 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$; NADH 0,20 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$; malate dehydrogenase 10,0 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{l}^{-1}$; lactate dehydrogenase 15,0 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{l}^{-1}$; 30°C. Volume fraction of serum: 0,0833.

Fig 2.3



Dependence of the catalytic concentration of aspartate aminotransferase on concentration of L-aspartate. The sources of enzyme were pools of human sera from patients with heart and liver diseases ("heart enzyme" and "liver enzyme"). Conditions of measurement: Tris buffer, pH = 7,8, 80 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$; pyridoxal phosphate 100 $\mu\text{mol} \times \text{l}^{-1}$; 2-oxoglutarate 12 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$; NADH 0,20 $\text{mmol} \times \text{l}^{-1}$; malate dehydrogenase 10,0 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{l}^{-1}$; lactate dehydrogenase 15,0 $\mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \text{l}^{-1}$; 30°C. Volume fraction of serum: 0,0833.

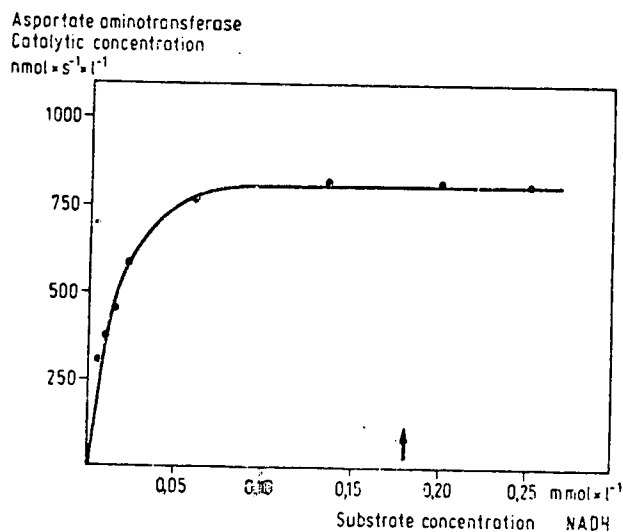
2.1.1.4 Indikator ensieme

Die oksaloasetaat, substraat van die indikator reaksie, kan nie-ensiematies gedekarboksileer word om piruvaat te vorm. Piruvaat kan ensiematies omgeskakel word na laktaat en NADH en H^+ . Daarom is die byvoeging van laktaatdehidrogenase en malaatdehidrogenase nodig om te verseker dat volledige reduksie van die endogene piruvaat en oksaloasetaat plaasvind, voordat die reaksie begin word [8]. 'n Konsentrasie van $10 \mu\text{mol/sekonde}/\ell$ van beide ensieme is deur die IFKC aanbeveel.

2.1.1.5 NADH konsentrasie

'n NADH konsentrasie van $0,18 \text{ mmol}/\ell$ is voorgestel vir optimale reaksie tempo (fig 2.4) en dit is ook voldoende om die reduksie van piruvaat wat in die plasma mag voorkom gedurende die preinkubasie periode, te verseker.

Fig 2.4



Indicator reaction: The dependence of the catalytic concentration of aspartate aminotransferase on the concentration of NADH. Conditions: Tris buffer, $\text{pH} = 7,8$, $80 \text{ mmol} \times \ell^{-1}$; pyridoxal phosphate $100 \mu\text{mol} \times \ell^{-1}$; L-aspartate, $200 \text{ mmol} \times \ell^{-1}$; 2-oxoglutarate, $12 \text{ mmol} \times \ell^{-1}$; malaat dehydrogenase, $10,0 \mu\text{mol} \times \text{s}^{-1} \times \ell^{-1}$; 30°C .

2.1.2 *Metode vir bepaling van AST soos ontwerp vir ons eksperimentele prosedures*

2.1.2.1 Bereiding van hemolisate vir AST bepaling

Veneuse bloed is in heparienbuis getrek, die hoeveelheid bloed in die buis is gemerk en daarna vir 5 minute teen 3 000 rpm op 'n Sorval sentrifugeerapparaat m.b.v. 'n SM24 draaikop gesentrifugeer. Die boonste helder plasma gedeelte is, d.m.v. 'n pasteurpipet afgesuig en gehou vir AST aktiwiteit bepaling. Daarna is ook die witsellaag so goed as moontlik verwyder en weggegooi. Die gepakte rooibloedselle is drie maal met 'n isotoniese NaCl oplossing gewas. Dit is gedoen deur telkens vir 5 minuut periodes te sentrifugeer en na elke was die NaCl te verwyder en met skoon NaCl te vervang. Daarna is die eritosiete gehemoliseer deur koue gedistilleerde water tot by die heelbloedvolume by te voeg en vir 10 minute te laat staan. Uit die gekonsentreerde hemolisaatoplossing is met gedistilleerde water 'n 1 tot 20 verdunning gemaak. Die seldebries is verwyder d.m.v. sentrifugering vir 20 minute teen 10 000 rpm. Die helder supernatant is, vir AST aktiwiteitsbepaling gebruik. Die hemoglobien konsentrasie van elke monster is m.b.v. 'n Coulter-teller bepaal.

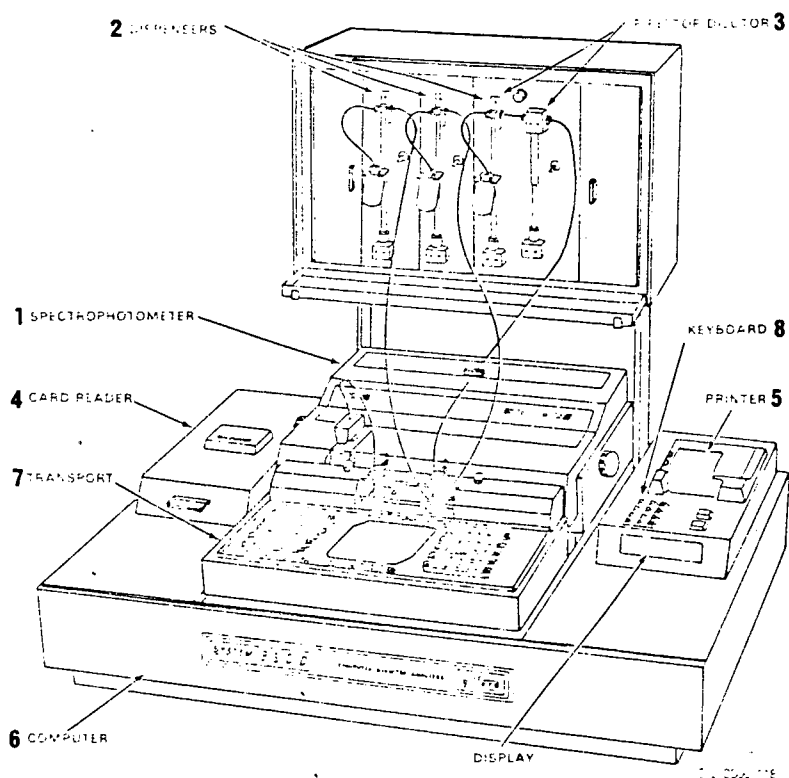
2.1.2.2 Chemikalië gebruik vir AST bepaling

L-aspartiensuur, pirodoksaal-5'-fosfaat in die kristallyne vorm, en α -Ketoglutaarsuur as 'n kristallyne monokaliumsout is vanaf Sigma verkry. Miles produkte wat gebruik is, is nikotienamiedadeniendinukleotied in die gereduseerde vorm, laktaatdehidrogenase en malaatdehidrogenase. Verder is ook Tris(hidroksiemetiel)aminmetaan vanaf Merck en natruimchloried vanaf SAARCHEM gebruik.

2.1.2.3 Apparaat gebruik vir bepaling van AST aktiwiteit

'n Gilford sisteem 3 500 rekenaargerigte analiseerder is gebruik vir die bepaling van AST aktiwiteit. Dit behels 'n

geautomatiseerde analitiese sisteem waarvan die funksies geprogrammeer word m.b.v. voorafgeprogrammeerde magnetiese kaarte. Die sisteem bestaan uit die volgende komponente (fig 2.5).



System 6-500 Components

Fig 2.5

(Uit tegniese handleiding vir apparaat)

1. 'n Spektrofotometer met grense tussen 340 nm - 700 nm, asook termokuvette.
2. 'n Hamilton spuit wat reagens lewer vanaf 'n houër wat daaraan verbind is.
3. 'n Pipetverdunner wat 'n geselekteerde hoeveelheid monster vanaf 'n monstercopie neem en dan die monster saam met die regte hoeveelheid reagens in 'n reaksiekopie spuit.

4. 'n Kaartleser, met 'n magnetiese leeskop, wat die voorafgeprogrammeerde magnetiese kaart lees en die rekenaar programmeer vir die bepalingsprosedures.
5. 'n Alfa-numeriese drukker wat deur die rekenaar beheer word.
6. Die rekenaarsisteem.
7. 'n Vervoerrak wat die monsterkoppies en die reagenskoppies onder die monsternemingspuit en verdunningspuit deurvoer.
8. 'n Sleutelbord waarmee waardes, aangevra deur die program, in getik word.
9. Die beginsels waardeur die apparaat werk:

Fig 2.6 toon 'n blokdiagram van die 3 500 sisteem

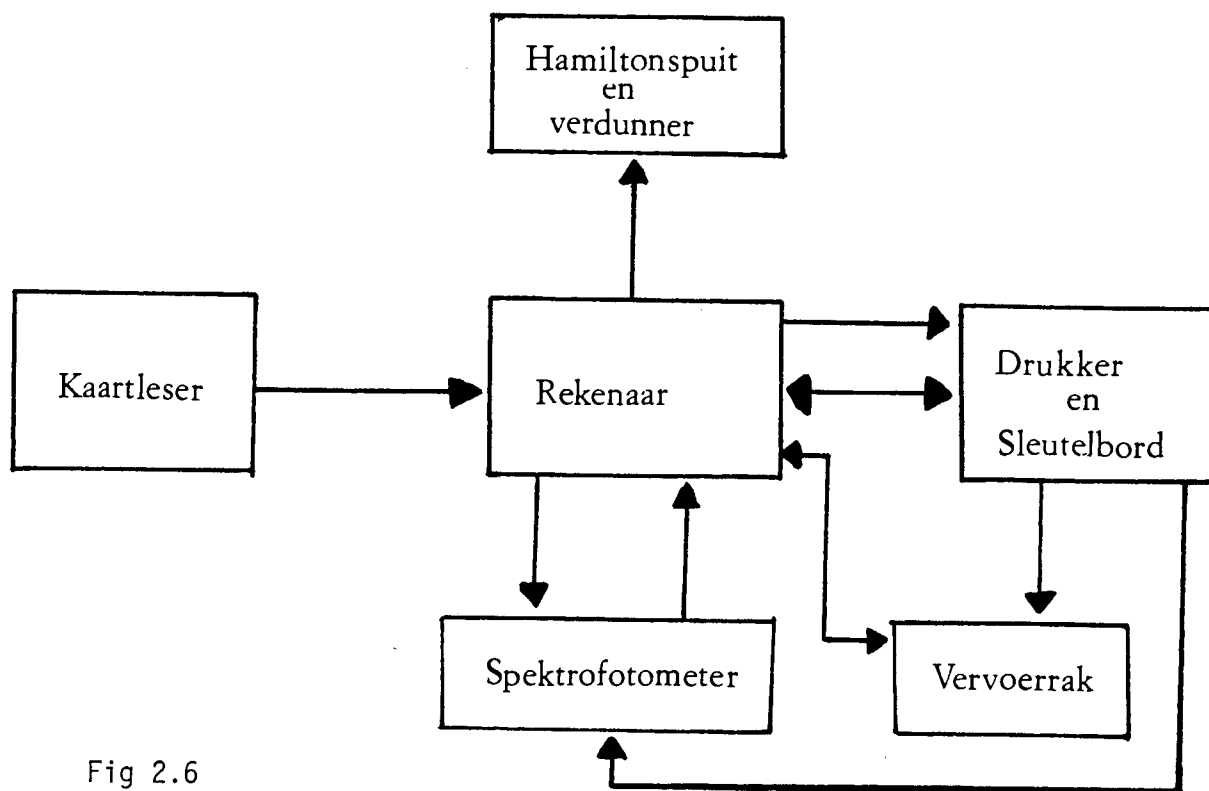


Fig 2.6

Wanneer die program deur die kaartleser gestuur word, neem die magnetiese opneemkop, die data vanaf die kaart op en word die inligting op die programkaart in die geheue van die rekenaar gestoor. Met aanvang van die bepaling word die inligting vanaf die geheue herroep en word die ander komponente van die sisteem gerig om die werksfunksies soos monsterneming, reagensbyvoeging en vervoerbeweging, te verrig. Die berekeningsprosesse betrokke by die reaksie word ook vanaf die geheue herroep en verwerk deur die rekenaar. Die verwerkte resultate word dan deur die drukker uitgedruk, as internasionale eenhede per liter. Dit verteenwoordig die hoeveelheid ensiem wat die reaksie van een mikromol substraat per minuut kataliseer.

10. Verskillende tye betrokke by AST aktiwiteitsbepaling.

Die programkaart vir die bepaling van AST aktiwiteit, berus op 'n algemene kinetiese beginsel geprogrammeer vir 'n dubbel reagens byvoeging, waar die tweede reagens by die reaksiemengsel gevoeg word net voor die reaksiemengsel na die termokuvet opgesuig word. Die tweede reagens is dus nodig om die reaksie aan die gang te sit. Verskillende inkubasietye wat sodoende ontstaan is:

- Preinkubasietyd: Dit is die tyd tussen die vermenging van die monster en reagens totdat die reaksiemengsel opgesuig word direk nadat die tweede reagens bygevoeg is.

- Inkubasietyd: Dit is die tyd waartydens die reaksiemengsel in die termokuvet bly voordat meting begin. Hierdie tyd moet lank genoeg wees om toe te laat vir stabilisering van die reaksie totdat dit lineêr verloop.

- Leestyd: Dit is die tyd waarin die 3 500 sisteem die absorbansieverandering bereken. Die totale integrasietyd is 1,5 keer langer as die leestyd. Die integrasietyd word

in 3 gelyke intervalle verdeel waartydens 7,7 lesings per sekonde geneem word. Die gemiddeld van hierdie lesings oor die interval is dan die absorpsie.

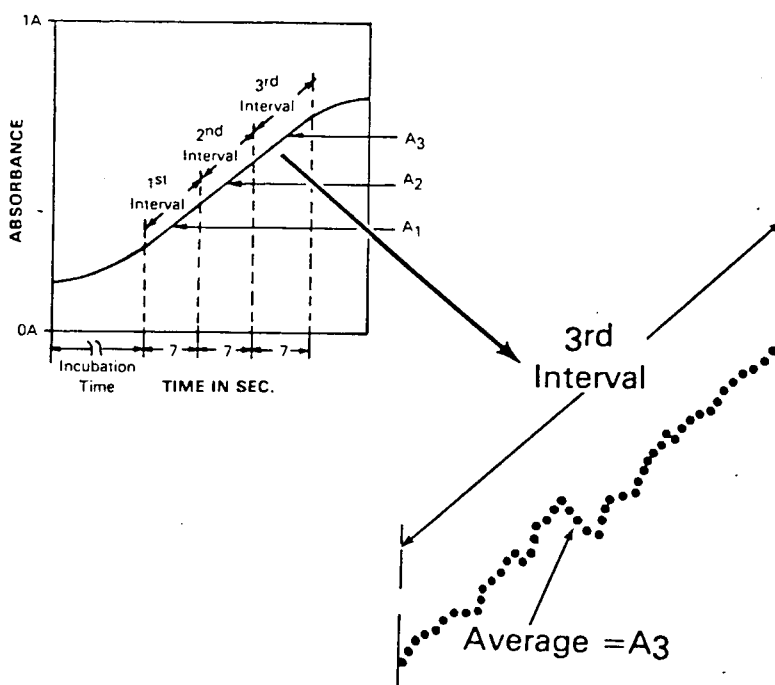


Fig 2.7

(Uit tegniese handleiding vir apparaat)

Soos getoon in bg. figuur is A_1 , A_2 en A_3 die gemiddelde absorpsies van elke interval. Die verskil in tyd van A_1 tot A_3 is twee derdes van die totale integrasietyd en staan dan bekend as die leestyd. Die verskil tussen die eerste en derde interval is die verandering in absorpsie en dit word dan verwerk deur die rekenaar en uitgedruk in terme van Internasionale Eenhede per liter (IE/l).

2.1.2.4 Standardisering van AST bepalingmetode vir gebruik op die Gilford sisteem.

(i) Werksreagens:

Die werksreagens bevat in 'n volume van 1 ml, 97 mmol/l Tris HCL; 288 mmol/l L-aspartaat; 0,20 mmol/l NADH, asook 8,38 $\mu\text{mol/sekonde/l}$ MDH en 11 $\mu\text{mol/sekonde/l}$ LDH. In die geval van bepaling in die teenwoordigheid van PLP, is 119 $\mu\text{mol/l}$ PLP ook teenwoordig.

Die konsentrasie van die tweede reagens wat bygevoeg word vir die inisiëring van die reaksie nl. oxoglutaraat, is 144 mmol/l en 100 μl daarvan word by die reaksiemengsel gevoeg.

(ii) Aanvanklike roetine metode:

Die aanvanklike roetine metode, gebruik vir die bepaling van AST aktiwiteit op die geoutomatiseerde Gilford sisteem is uitgevoer sonder die byvoeging van PLP by die reaksiemengsel.

Een milliliter werksreagens is by 100 μl monster gevoeg en vir ses minute gepreinkubeer. Daarna is 100 μl oxoglutaraat bygevoeg vir die inisiëring van die reaksie en 'n inkubasietyd van 15 sekondes is toegelaat voordat die afname in absorpsie van NADH na NAD oor 20 sekondes gelees is en verwerk is na 'n finale waarde in terme van IE/l. 'n Optimale produktiwiteit van 41 monsters per uur is volgens hierdie metode op die Gilford sisteem verkry. Die inkubasie periode en leestyd vind by 'n temperatuur van 37°C plaas.

Met hierdie metode is 'n hoër variasiekoëffisient (V) as verwag by beide die hemolisate sowel as die plasma gevind, soos gesien kan word in Tabel 2.1

Resultate:

Tabel 2.1

Monster	Ensiemaktiwiteit in IE/ℓ		
	-PLP	+PLP	% Stim.
Hemolisaat	46	74	60,9
	40	80	100,0
	40	71	77,5
	37	70	113,5
Gemiddeld	40,8	76,0	87,98
S	3,8	4,2	23,37
V	9,3	5,6	26,6
Plasma	35	29	-
	34	32	-
	30	21	-
	30	28	-
Gemiddeld	32,3	27,5	-
S	2,6	4,7	-
V	8,2	16,9	-

S : Standaard afwyking

V : Variasiekoëffisient

In die geval van plasma kon daar nie 'n aktivering van ensiemaktiwiteit aangetoon word na die byvoeging van PLP by die reaksie medium nie. Hamfelt [57] het aangetoon dat AST wel in die onversadigde apoensiemvorm in die plasma voorkom en in vitro deur die byvoeging van PLP geaktiveer kan word.

As gevolg van bogenoemde resultate is die bestaande metode in heroorweging geneem en is optimale toestande vir bepaling van AST, ook met die byvoeging van PLP by die reaksiemengsel, op die Gilford sisteem bepaal.

(iii) Standardisering van AST metode op Gilford sisteem.

Die volgende parameters is in oorweging geneem in die bepaling van optimum toestande.

Preinkubasietye

Inkubasietye

Leestyd

a) Preinkubasietye

AST aktiwiteit in plasma en hemolisate is bepaal by preinkubasietye van 0, 300 (5), 450 ($7\frac{1}{2}$), 600 (10) en 900 (15) sekondes (min). Die inkubasietyd was konstant 90 sekondes en die leestyd 180 sekondes, gedurende hierdie bepaling.

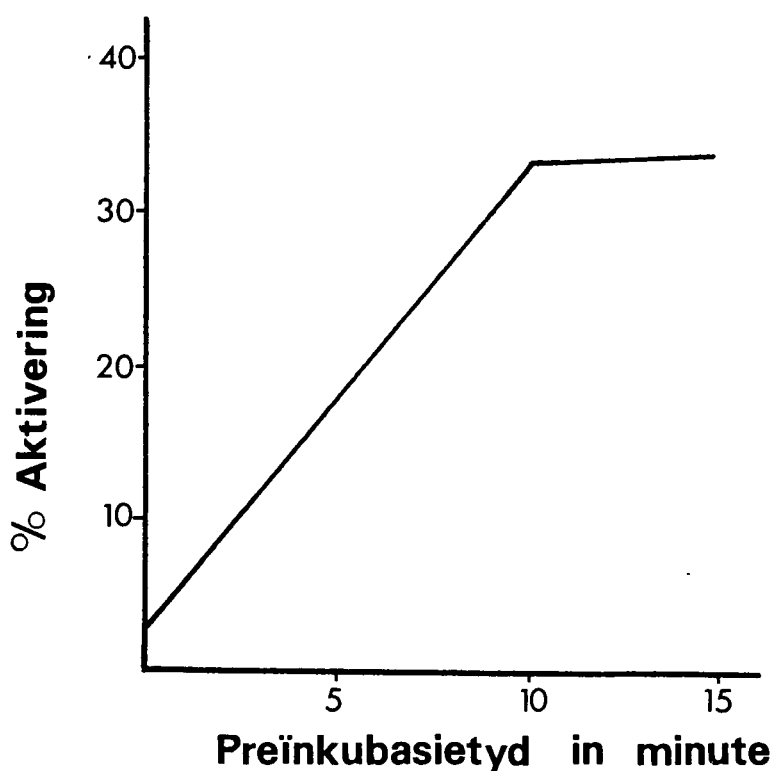


Fig 2.8 Aktivering van AST aktiwiteit in plasma, met PLP na verskillende preïnkubasietye.

In die plasma was daar vanaf 0-10 minute 'n skerp toename in die % aktivering van AST aktiwiteit vanaf die basale vlak tot na die byvoeging van PLP by die reaksiedium. Van 10 tot 15 minute het daar 'n effense styging voorgekom van 33,6 tot 34,5 persent maar dit kan beskou word as normale variasie. Hieruit kon afgelei word dat totale aktivering van AST aktiwiteit in plasma eers na 'n preïnkubasie periode van minstens 10 minute voorkom.

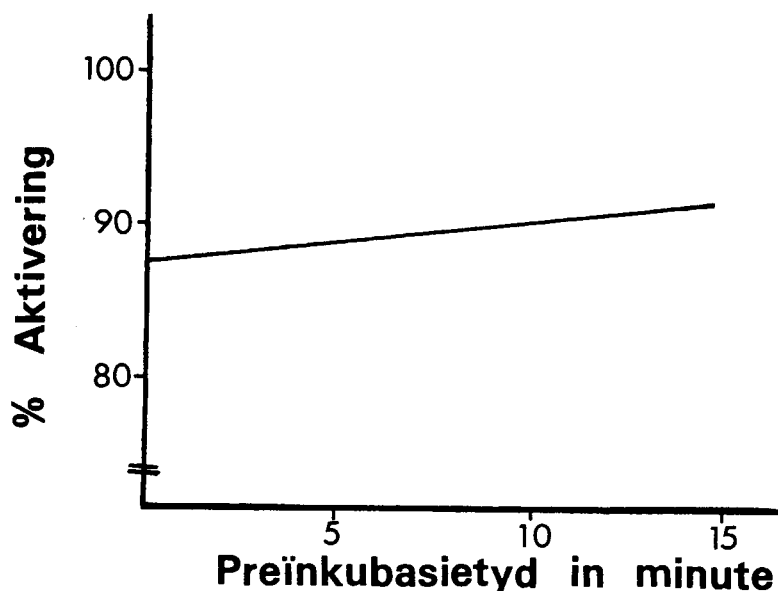


Fig 2.9 Aktivering van AST aktiwiteit in hemolysate na verskillende preïnkubasietye met PLP.

By hemolysaat AST is daar 'n effense styging vanaf 0-15 minute, maar dit kan slegs 'n aanduiding wees van normale variasie aangesien feitlik volledige versadiging van ensiem deurgaans voorkom.

'n Verskil in preïnkubasietyd nodig vir volledige aktivering van die ensiem, tussen plasma AST en hemolysaat AST kom dus voor. Hierdie verskil is verder ondersoek in 2.2. Uit 'n

Resultate : Tabel 2.2

Inkubasie IN sekondes	Ensiemaktiwiteit (IE/l)					
	Plasma			Hemolisate		
	-PLP	+PLP	% Aktivering	-PLP	+PLP	% Aktivering
15	18,2	23,3		32,0	62,0	
	20,0	24,0		31,0	59,0	
	19,1	23,7	24,1 %	34,0	60,5	87,3 %
Gem.	19,1	23,7		32,3	60,5	
S	0,9	0,35		1,53	1,50	
V	4,7%	1,5%		4,7%	2,5%	
30	19,0	23,3		32,0	62,0	
	21,0	24,0		30,0	59,0	
	20,0	23,7	18,5 %	30,9	60,0	95,5 %
Gem.	20,0	23,7		30,9	60,6	
S	1,00	0,35		1,00	1,52	
V	5,00	1,5%		3,2%	2,5%	
90	18,9	23,6		31,7	62,4	
	19,4	23,7		31,3	62,5	
	20,1	24,4	22,6 %	32,2	63,1	97,8
Gem.	19,5	23,9		31,7	62,7	
S	0,6	0,44		0,45	0,38	
V	3,1	1,8%		1,4%	0,6%	

praktiese oogpunt is preinkubasietye van 12 minute vir hemolisate en 16 minute vir plasma, deurgaans verder in die studie gedurende AST aktiwiteitsbepalings gebruik.

b) Inkubasietye

Met 'n konstante preinkubasietyd van 10 minute en 'n leestyd van 180 sekondes is die inkubasietyd, waartydens die reaksiemengsel in die termokuvet by 37°C is, gevarieer tussen 15, 30 en 90 sekondes. (Tabel 2.2)

'n Goeie herhaalbaarheid is in alle gevalle gevind maar die produktiwiteit was onbevredigend. Met 'n inkubasietyd van 15 en 30 sekondes kon 8 bepalinge per uur gedoen word. 'n Preinkubasietyd van 90 sekondes het slegs 7 bepalinge per uur toegelaat.

Om te sien of 'n hoër produktiwiteit bereik kan word, sonder om akkuraatheid in te boet is die leestyd verkort na 60 sekondes en die inkubasietyd verleng na 120 sekondes.

TABEL 2.3

Inkubasietyd in sekondes	Ensiemaktiwiteit (IE/ℓ)					
	Plasma			Hemolisate		
	-PLP	+PLP	% Aktivering	-PLP	+PLP	% Aktivering
120	19,4	23,9		33,2	65,2	
	19,2	23,0		32,5	62,6	
	20,1	24,5	21,4 %	34,6	64,9	92,2 %
Gem	19,6	23,8		33,4	64,2	
S	0,47	0,75		1,07	1,42	
V	2,4 %	3,2 %		3,2 %	2,2 %	

Resultate was steeds bevredigend in terme van herhaalbaarheid en produktiwiteit is verdubbel na 15 bepalinge per uur (4 minute/bepaling).

c) Leestyd:

Aanvanklike leestyd is gestel op 180 sekondes maar aangesien die produktiwiteit verlaag is, is dit verkort na 60 sekondes, wat steeds bevredigende resultate gelewer het (sien tabel 2.2 en 2.3).

Samevattend:

Optimale toestande vir bepaling van AST aktiwiteit op die Gilford sisteem in terme van inkubasie en preinkubasietye, wat vir die duur van die studie gebruik is, is as volg:

Preinkubasietyd :	Plasma - 16 minute
	hemolisaat - 12 minute
Inkubasietyd :	deurgaans 120 sekondes
Leestyd :	deurgaans 60 sekondes

2.2 Die invloed van verskillende preinkubasietye op die aktivering van Aspartaataminotransferase deur Piridoksaal-5-fosfaat.

In geoutomatiseerde prosedures [118] word heel dikwels van korter preinkubasietye gebruik gemaak as wat deur die IFKC aanbeveel is. Gedurende die ondersoek van optimale toestande vir die bepaling van AST aktiwiteit op die Gilford sisteem, is 'n verskil in aktiveringseienskappe van AST aktiwiteit na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium, tussen plasma en hemolisaat gevind. In plasma monsters was 'n preinkubasietyd van 6 minute, onvoldoende vir volledige aktivering van ensiemaktiwiteit.

Om hierdie verskille verder te definieer is eksperimente op plasma en hemolisaat uitgevoer om die volgende parameters te ondersoek.

2.2.1 Normale AST aktiwiteitskurwes sonder byvoeging van PLP.

2.2.2 Optimale preinkubasietye na byvoeging van PLP.

2.2.3 Lae en hoë PLP konsentrasies.

2.2.4 Die invloed van temperatuur.

2.2.5 Verskille in apoensiem gedrag in normale monsters en in plasma van siek persone.

2.2.1 Plasma en hemolisaat AST aktiwiteit by kamertemperatuur sonder die *in vitro* byvoeging van PLP.

AST aktiwiteit is in die plasma en hemolisaat, berei vanaf bloed verkry van 'n normale persoon, op die Gilford sisteem bepaal. Die monster en werksreagens (sonder PLP) is vir 2,4,6,8,10 en 12 minute saam gepreinkubeer voordat oxoglutaraat bygevoeg is vir die inisiering van die reaksie, waarna die reaksiemengsel opgesuig is na die termokuvet. By alle bepalinge verder in hierdie afdeling is 'n inkubasietyd van 120 sekondes in die termokuvet (by 37°C) toegelaat voordat die verandering in absorpsie oor sestig sekondes deur die rekenaar van die Gilford sisteem gelees en verwerk is.

In figuur 2.10 kan gesien word dat geen inhibisie of aktivering van AST aktiwiteit gedurende enige van die preinkubasie periodes voorgekom het nie. AST bepaling op die Gilford sisteem, sonder die byvoeging van PLP, is dus nie afhanklik van 'n preinkubasietyd vir herhaalbare resultate nie. Daar is ook geen verskil in die aktiwiteitspatroon tussen plasma en hemolisaat gevind nie.

2.2.2 Optimale preinkubasietyd vir volle aktivering van AST aktiwiteit deur PLP by kamertemperatuur.

AST aktiwiteit is in die plasma en bereide hemolisaat van drie normale gesonde persone bepaal. Preinkubasie tye van

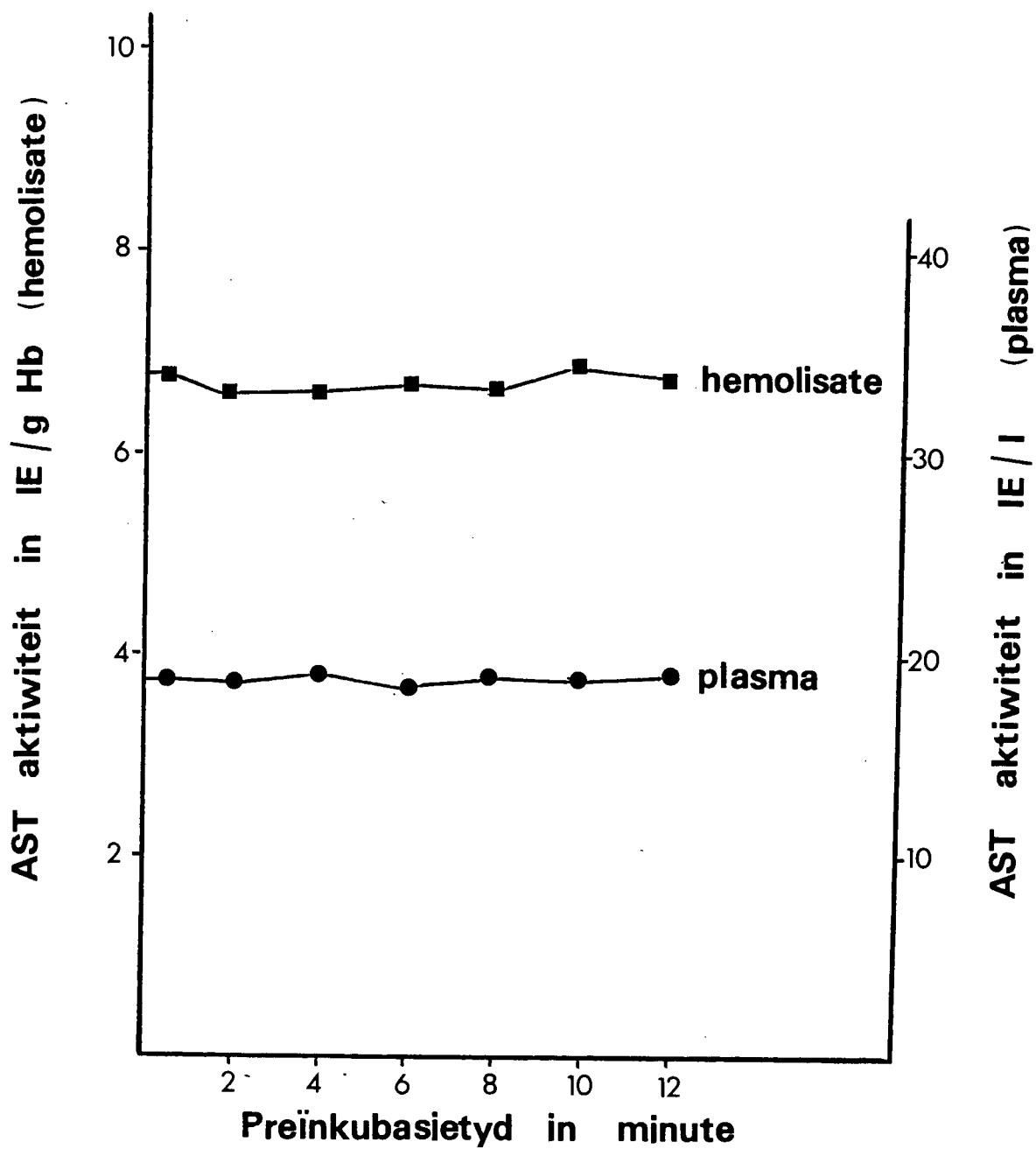


Fig 2.10 Plasma en hemolisaat AST aktiwiteit by kamertemperatuur sonder die in vitro byvoeging van PLP.

0,5; 2;4...12 by hemolisate en 0,5 ; 2;4...20 by plasma waartydens die monster geïnkubeer is met reagens waarby PLP gevoeg is, is toegelaat. Die % aktivering van AST aktiwiteit verkry deur die teenwoordigheid van PLP is bereken en grafies voorgestel (fig 2.11)

'n Definitiewe verskil in aktiveringspatroon van AST aktiwiteit kan tussen die plasma en hemolisaat monsters waargeneem word. In die hemolisate kom volledige aktivering van AST aktiwiteit reeds na 'n preïnkubasietyd van $2\frac{1}{2}$ minute met PLP, voor. In die plasma kom daar egter aanvanklik eers 'n inhibisie van AST aktiwiteit voor. Eers na 3-7 minuut preïnkubasiëperiodes met PLP, bereik AST aktiwiteit dié vlak van aktiwiteit verkry voordat PLP by die reaksiedium gevoeg is. Volledige aktivering van AST aktiwiteit word in die plasma eers na 'n preïnkubasiëperiode van 10-12 minute met PLP, verkry.

2.2.3 *Invloed van hoë en lae PLP konsentrasie op preïnkubasietyd.*
 Werksreagense met PLP konsentrasies van 110 $\mu\text{mol}/\ell$ en 300 $\mu\text{mol}/\ell$ is vir dieselfde tye as in die vorige eksperimente met plasma en bereide hemolisate gepreïnkubeer voordat AST aktiwiteit bepaal is en % aktivering van ensiemaktiwiteit bereken is (fig 2.12).

Daar is geen betekenisvolle verskille tussen die normale situasie (soos by 2.2.2) en die verhoogde PLP konsentrasie, wat betref die preïnkubasietyd van plasma en hemolisate met PLP, voordat maksimum AST aktiwiteit bereik word nie. Die aanvanklike inhibisie van ensiemaktiwiteit gedurende preïnkubasie van plasma AST met PLP word steeds waargeneem en dit lyk of die hoër PLP konsentrasie selfs tot 'n groter inhibisie van AST aktiwiteit mag lei.

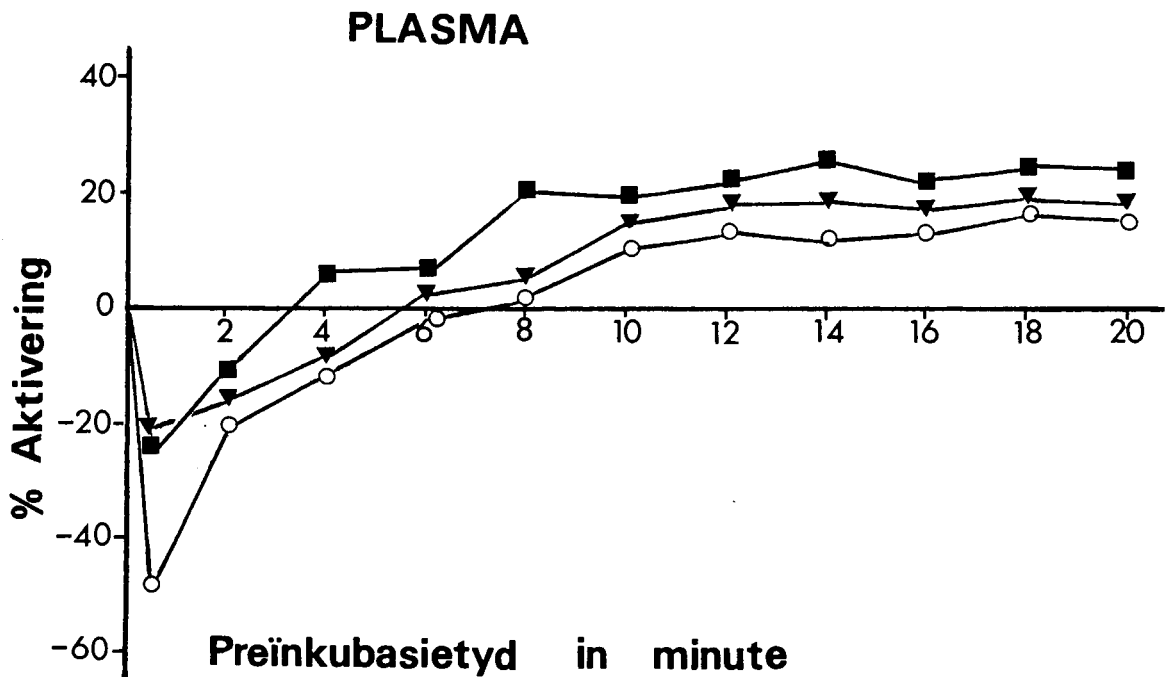
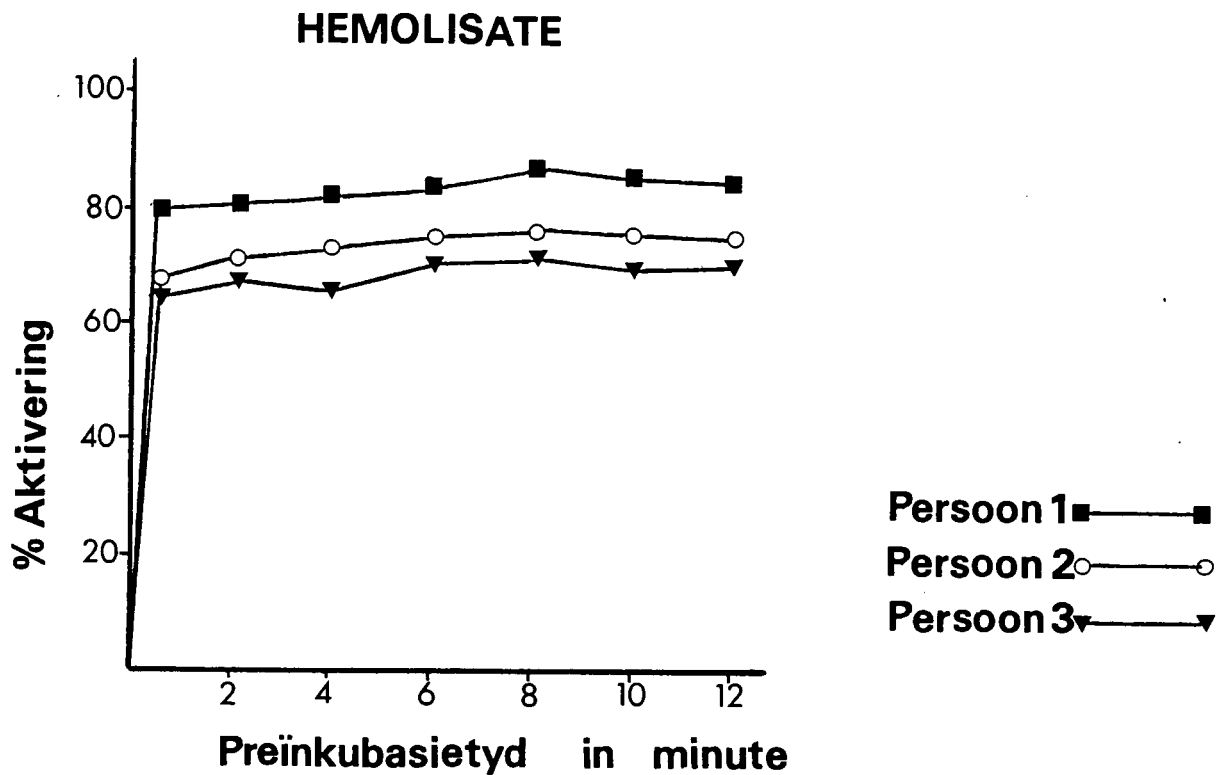
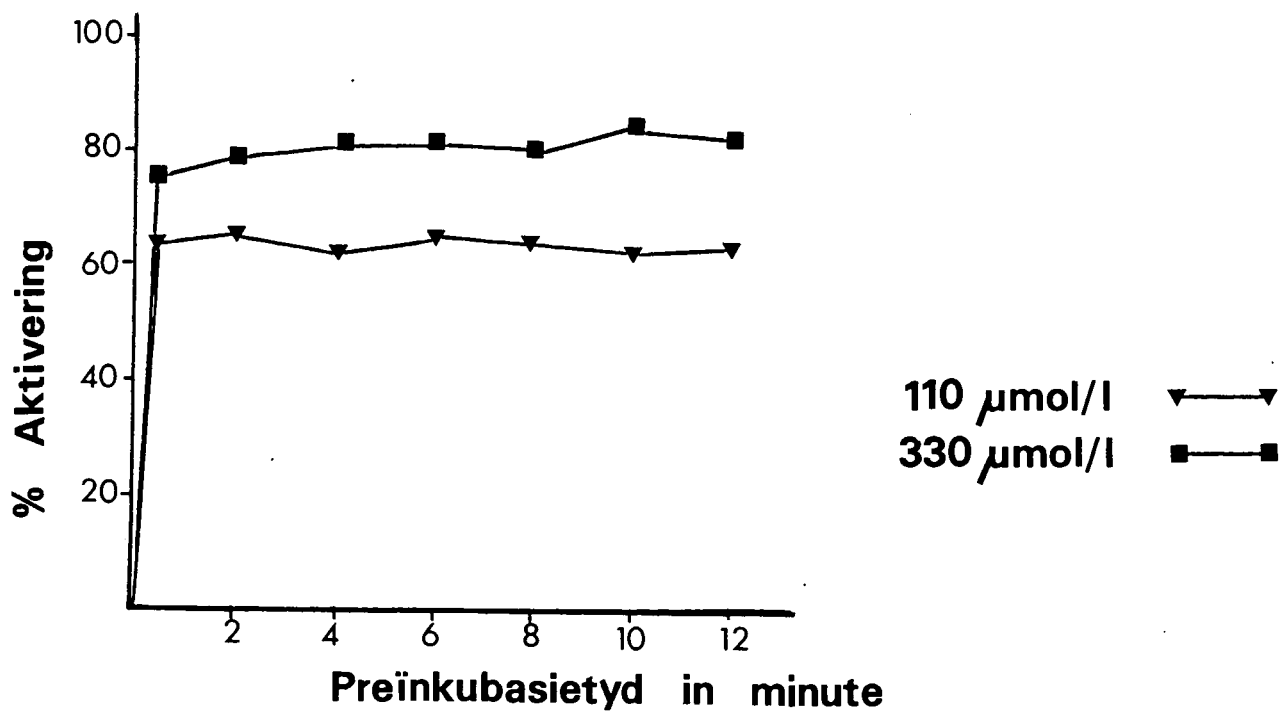


Fig 2.11 Optimale preinkubasietyd vir volle aktivering van AST aktiwiteit deur PLP, in plasma en hemolisaatmonsters van drie verskillende persone.

HEMOLISATE



PLASMA

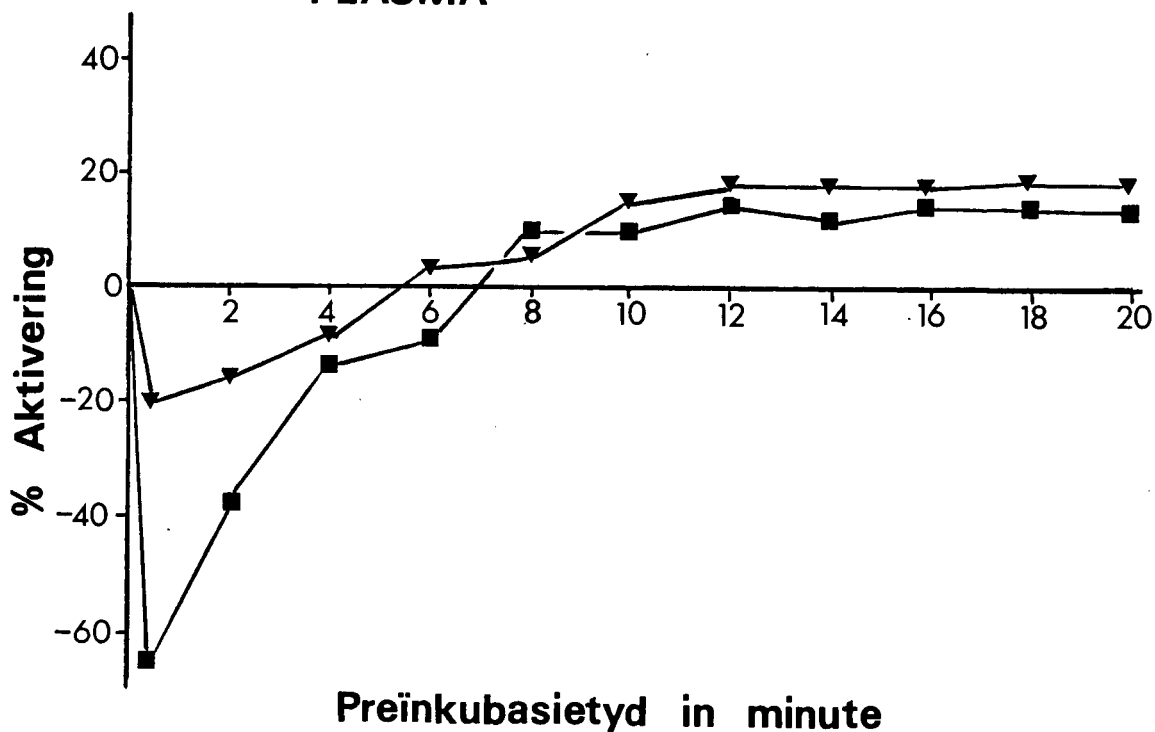


Fig 2.12 Die invloed van hoë en lae PLP konsentrasies op die aktiveringseienskappe van AST aktiwiteit in plasma en hemolisaat monsters.

2.2.4 *Invloed van temperatuur op preinkubasietyd*

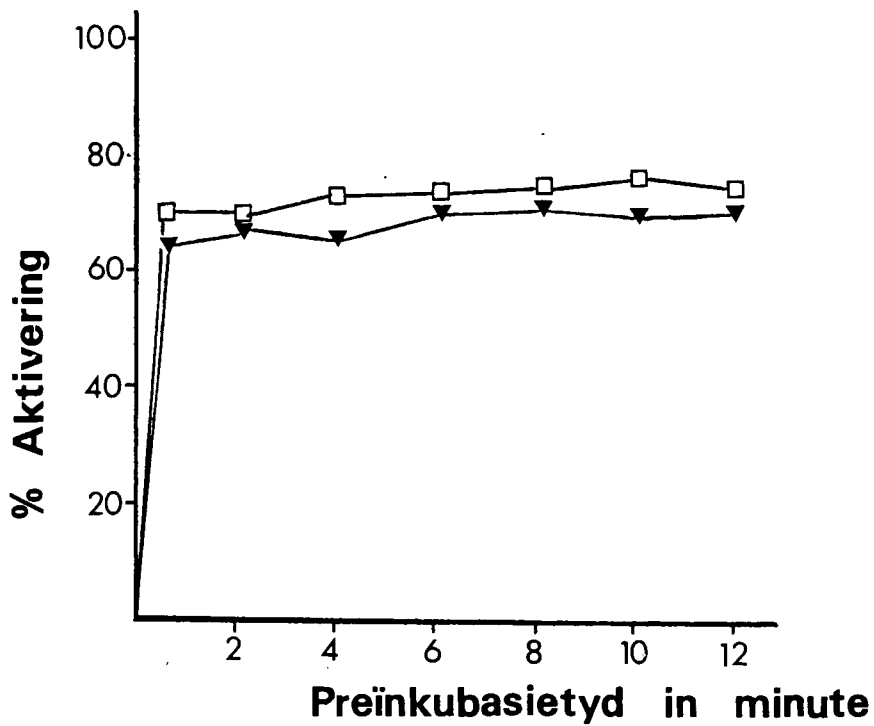
Reagens en monsters is vooraf in 'n 30°C waterbad gehou en is eers uitgehaal net voordat AST aktiwiteitsbepalings op die Gilford sisteem uitgevoer is. Resultate hierdeur verkry is vergelyk met resultate verkry wanneer reagens en monsters vooraf by kamperatuur gelaat is, voordat AST aktiwiteit bepaal is (Fig 2.13).

Geen betekenisvolle verskil van vorige eksperimente wat betref aktiveringseienskappe van plasma of hemolisaat AST kon aangetoon word nie.

2.2.5 *Verskille in apoensiem gedrag in normale plasma en in plasma van siek persone.*

Die aktivering van AST aktiwiteit na byvoeging van PLP is ondersoek in die plasma van 'n pasiënt met hepatitis, sowel as in die plasma van 'n pasiënt na 'n miokardiale infarksie. Tydens hierdie siektetoestande is daar 'n verhoging in plasma AST aktiwiteit. Dit is bekend [68] dat AST in die plasma van pasiënte met hepatitis, tot 'n groot mate in die holoensiem vorm voorkom en dus slegs tot 'n geringe mate verder geaktiveer kan word deur die byvoeging van PLP. In die geval van 'n miokardiale infarksie kom die ensiem egter tot 'n groter mate in die apoensiem vorm voor as in normale plasma. Die aktiveringseienskappe van plasma AST by hierdie twee siektetoestande is vergelyk met normale plasma om te sien of inaktivering voorkom en verlengde preinkubasie vereis word (Fig 2.14).

Die AST aktiwiteit in die plasma van siek persone toon dieselfde aktiveringseienskappe as waargeneem tydens aktivering van hemolisaat AST aktiwiteit. Volledige aktivering van ensiemaktiwiteit kom reeds binne 2½ minute preinkubasietyd voor en gevolglik word geen aanvanklike inhibisie van ensiemaktiwiteit waargeneem nie.



PLASMA

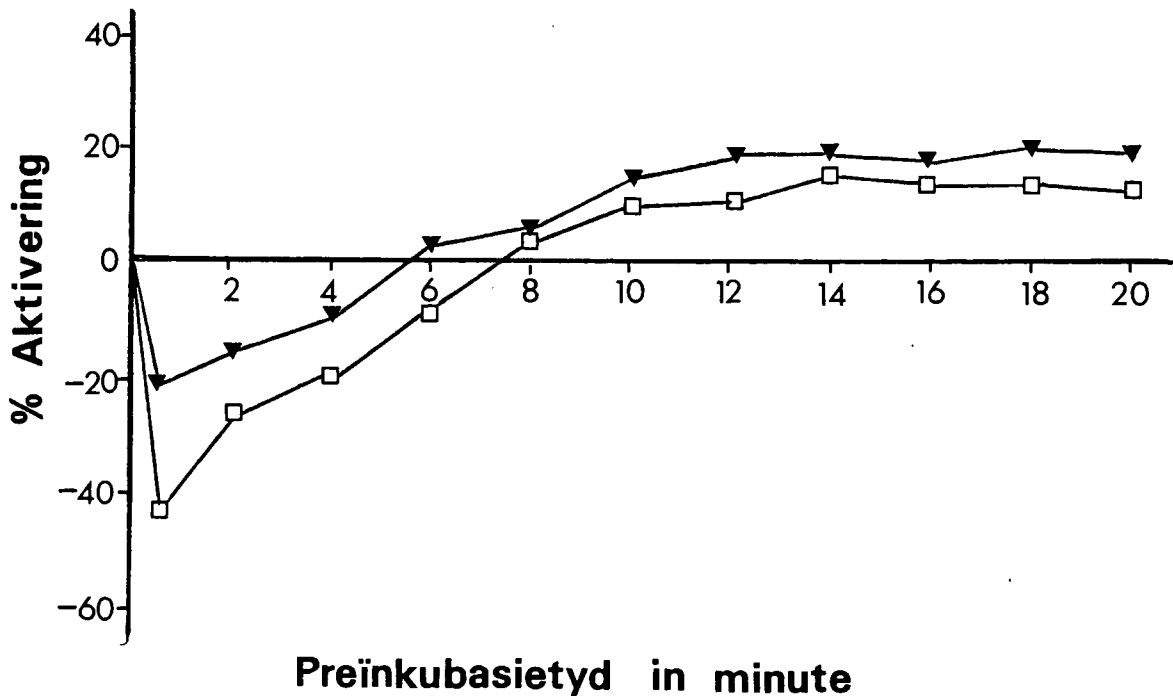


Fig 2.13 Die invloed van temperatuur op die aktiveringseienskappe van AST aktiwiteit in plasma en hemolisaat monsters.

Kamertemperatuur : □—□
 30°C : ▼—▼

PLASMA

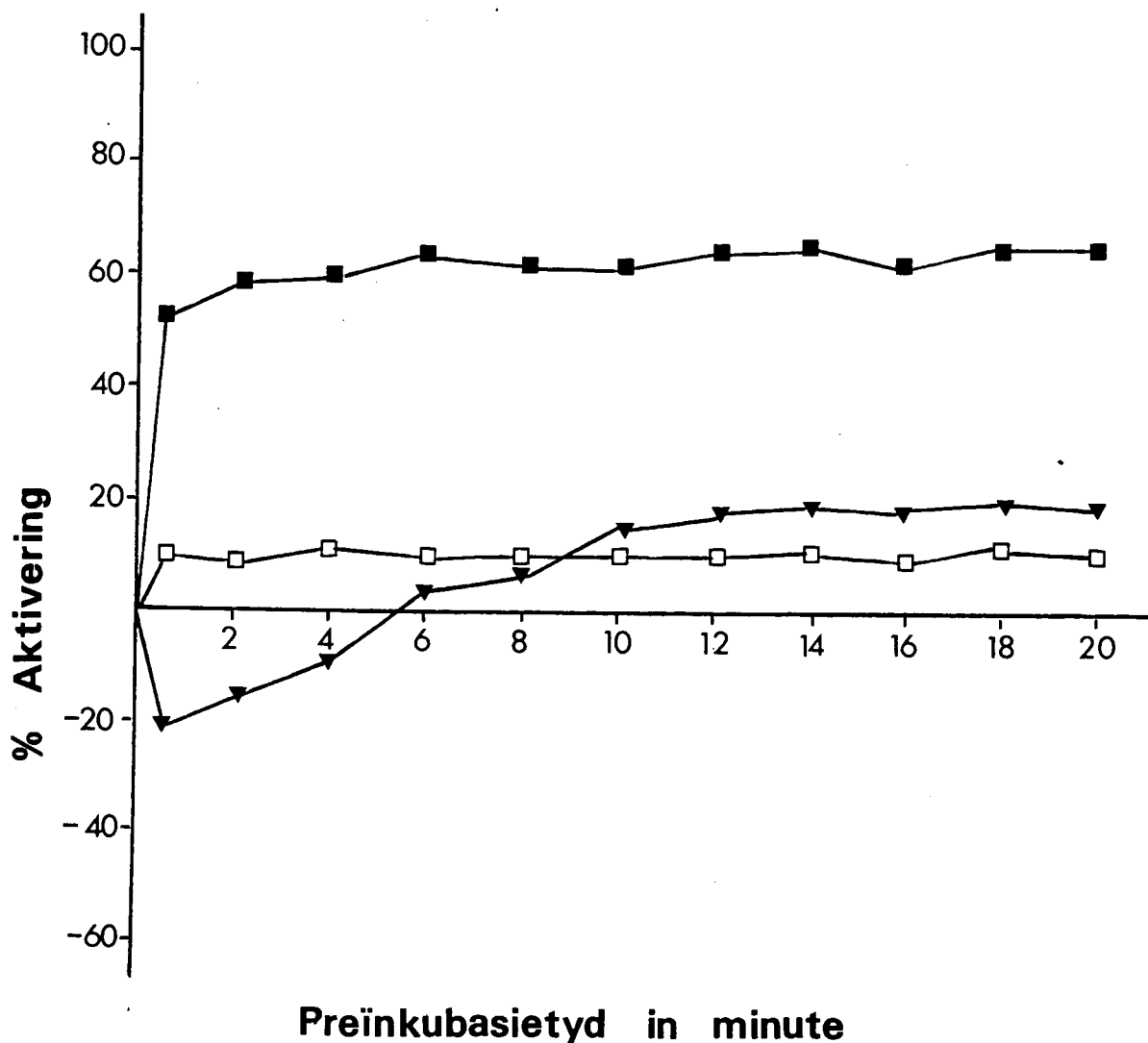


Fig 2.14 Die verskille in apoensiemgedrag na preïnkubasie met PLP in normale plasma en in plasma van siek persone.

Normale plasma : ▼—▼
 Plasma van 'n pasiënt na 'n miokardiale infarksie : ■—■
 Plasma van 'n pasiënt met lewersirroose : □—□

Samevattend:

Hierdie eksperimente toon dat totale aktivering van AST aktiwiteit reeds binne $2\frac{1}{2}$ minute in die hemolisate en eers na 12 minute in die plasma voorkom. In die normale plasma kom daar 'n aanvanklike inhibisie van ensiemaktiwiteit, na die byvoeging van PLP voor. Die preinkubasietyd nodig vir volle aktivering van AST aktiwiteit word nie beïnvloed deur 'n verhoogde PLP konsentrasie of temperatuur nie en val binne die normale variasie tussen persone (fig 2.2). Die aktiveringseienskappe van AST aktiwiteit in plasma van pasiënte na 'n miokardiale infarksie of lewersiektes verskil aansienlik van dié van normale mense en stem ooreen met die aktiveringseienskappe van AST in hemolisate.

2.3 Vasstelling van optimum toestande met bereiding van die monsters vir AST bepaling.

2.3.1 *Proefpersone en monsterverkryging*

Normale gesonde laboratorium personeel is deurgaans as proefpersone gebruik. Veneuse bloed is in:

- i) buise met verskillende antistolmiddels, en
 - ii) buise waarin die bloed toegelaat is om te stol, getrek.
- Die plasma is onmiddelik van die eritrosiete geskei, waarna die hemolisate volgens die metode beskryf in 2.1.2 berei is.

2.3.2 *Die Invloed van verskillende antistolmiddels op AST aktiwiteit.*

Die invloed van verskillende antistolmiddels op AST aktiwiteit is ondersoek. Dié AST aktiwiteit in die sera van gestolde bloed, sowel as in die stolsel, is ook ondersoek. Die antistolmiddels wat gebruik is, is: sitroensuurdekstrose (ACD); Etieleendiamientetra-asetaat (EDTA); heparien en natriumsitraat. Die bloed van een proefpersoon is gebruik.

Hemolisate is berei volgens die metode in 2.1.2 en die AST aktiwiteit in die hemolisate, plasma en sera, is met en sonder die toevoeging van PLP volgens die aanbevole IFKC metode (2.1.1), bepaal.

TABEL 2.4 Die invloed van verskillende antistolmiddels op AST aktiwiteit in hemolisate.

Hemolisate

Antistolmiddel	Ensiemaktiwiteit in IE/g Hb				% Aktivering
	-PLP		+PLP		
	AST	V	AST	V	
Geen	3,89 (3,36-4,26)	14,1 %	6,70 (6,32-6,94)	5,0 %	72,2 %
ACD	4,38 (4,08-4,46)	6,1 %	7,89 (7,79-7,96)	2,6 %	80,1 %
Heparien	5,15 (4,78-5,35)	6,3 %	9,27 (9,18-9,35)	0,9 %	80,0 %
EDTA	5,93 (5,44-6,30)	7,5 %	10,81 (0,38-11,11)	3,5 %	82,3 %
Natrium sitraat	4,59 (4,18-4,86)	7,9 %	8,58 (8,55-8,59)	0,3 %	86,9 %

Die variasie koëffisient (V) verkry van triplikaat bepalings van elke hemolisaat monster, is oor die algemeen heelwat laer by dié AST aktiwiteitsbepalings, na die byvoeging van PLP by die bepalingsmedium, soos aangedui in Tabel 2.4.

Die persentasie aktivering van die ensiem deur die byvoeging van PLP, is goed vergelykbaar in die hemolysate, berei uit nie-gestolde bloed (80,0-86,9 %). In die hemolysaat van gestolde bloed, was die persentasie aktivering effens laer (72,2 %). Dit is moontlik as gevolg van gedeeltelike inaktivering van die ensiem deur die stollingsproses.

TABEL 2.5 Die invloed van verskillende antistolmiddels op AST aktiwiteit in serum/plasma.

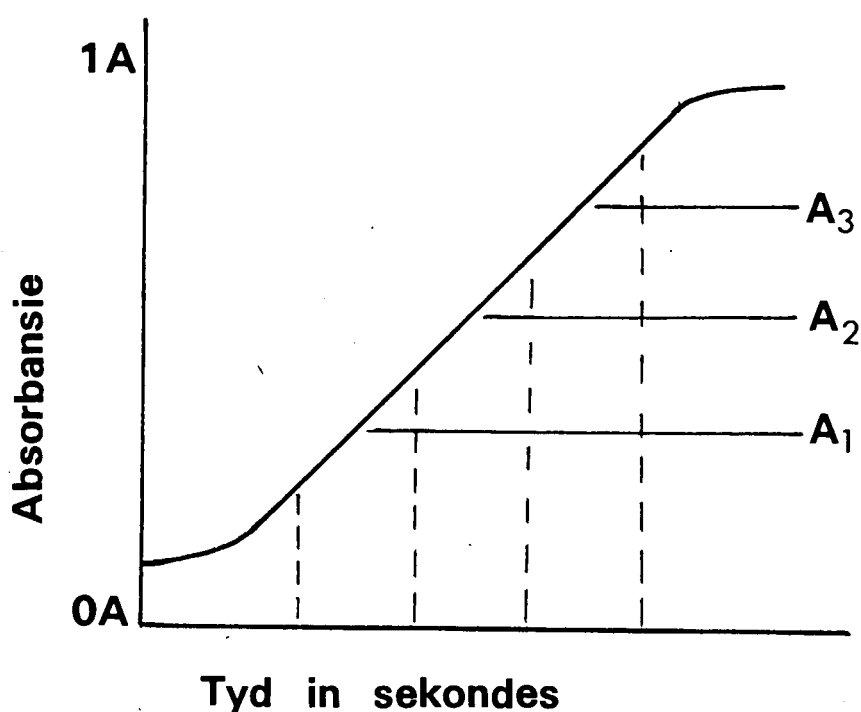
Serum/Plasma					
Antistolmiddel	Ensiemaktiwiteit in IE/ℓ				% Aktivering
	-PLP		+PLP		
	AST	V	AST	V.	
Geen	18,2 (15,9-20,1)	11,7 %	23,7 (23,1-25,9)	8,0 %	30%
ACD	13,9 (13,2-15,2)	8,3 %	16,5 (15,7-17,0)	4,2 %	18.7%
Heparien	16,4 (15,9-16,9)	3,1 %	20,9 (20,5-21,5)	2,5 %	27.4%
EDTA	17,2 (14,9 %-18,9)	12,0 %	19,0 (18,4-19,5)	3,9 %	10.5%
Natrium-sitraat	*13,4 (12,2-14,5)	8,6 %	*15,1 (14,1-16,9)	10,5 %	12.7%

* 'n Afwyking van lineêriteit van groter as 10 % kom voor tydens die ensiemaktiwiteitsbepaling

In die geval van serum of plasma was daar ook oor die algemeen 'n laer V in die teenwoordigheid van PLP. Die persentasie aktivering het egter 'n groter wisseling in hierdie geval as in die hemolisate getoon (10,8-30,2%). By serum asook plasma, verkry vanaf heelbloed met natriumsitraat as anti-stolmiddel, is die afwyking van die reaksie vanaf lineêriteit, tydens die bepaling van AST, groter as 10%. Hierdie afwyking word bereken volgens die vergelyking verkry uit fig 2.15

$$[(A_2 - A_1) - (A_3 - A_2)] / (A_3 - A_1) \times 100 = \% \text{ Afwyking van lineêriteit.}$$

Fig 2.15



Op grond hiervan is hierdie twee monsters beskou as ongeskik vir die bepaling van AST aktiwiteit volgens die metode beskryf in 2.1.1. Van die oorblywende drie antistolmiddels, naamlik ACD, heparien en EDTA, het heparien die hoogste totale AST aktiwiteit en die laagste V gelewer (Tabel 2.5).

Hoewel Hafkenschied en Hectors [119] geen verskil in AST aktiwiteit tussen serum en geheparieniseerde plasma gevind

het nie, is heparien as antistolmiddel gekies vir die duur van die studie. Dit blyk die mees geskikte keuse te wees vir die bepaling van AST aktiwiteit in beide die hemolisaat en plasma op die metode beskryf vir die Gilford sisteem (2.1.5)

2.3.3 *Preinkubasie van AST met PLP.*

Die doel van hierdie ondersoek was om te bepaal of daar 'n verskil in die aktiwiteit en persentasie aktivering van AST aktiwiteit in die teenwoordigheid van PLP is wanneer:

- (i) PLP en die monster alleen gepreinkubeer word en
- (ii) PLP, monster en reagens saam gepreinkubeer word.

Daar is as volg te werk gegaan;

Metode A : 950 $\mu\ell$ van 'n 6,3 mmol/l PLP oplossing is by 5 ml hemolisaat gevoeg om 'n finale konsentrasie van 0,643 mg PLP per ml hemolisaat te gee. Die PLP en monster is vir verskillende tye (10-42 minute) gepreinkubeer, waarna die regte hoeveelheid reagens met die hand m.b.v. die Gilford verdunner by die PLP monster gevoeg is. Die reaksie is begin deur die outomatiese byvoeging van oxoglutaraat deur die Gilford analiseerder. Alle bepalings is in triplikaat gedoen.

Metode B: In hierdie geval is die PLP en die sg eerste reagens saam opgemaak en outomaties deur die Gilford by die monster gevoeg. Die PLP-reagens-monster mengsel is dan vir dieselfde tye soos in metode A gepreinkubeer en die reaksie is ook deur die byvoeging van oxoglutaraat begin.

TABEL 2.6 Preïnkubasie van AST met PLP volgens twee verskillende metodes.

Preïnkubasie tyd in minute	Ensiemaktiwiteit in IE/ℓ				
	-PLP	Metode A		Metode B	
		+PLP	% Akt.	+PLP	% Akt.
10	37,5 (36,3-39,3)	65,8 (65,5-66,3)	73,3 %	68,6 (68,1-69,2)	83,0 %
14		65,8 (64,0-66,9)	75,5 %	68,2 (64,9-70,2)	82,0 %
18		68,0 (64,8-70,4)	81,3 %	68,2 (67,0-69,4)	82,0 %
22		69,6 (69,1-70,2)	85,9 %	69,3 (67,2-72,1)	84,5 %
26		68,9 (64,5-73,3)	83,7 %	69,8 (69,1-70,7)	86,1 %
30		69,5 (68,3-70,6)	85,3 %	72,1 (69,6-75,0)	92,3 %
34		68,3 (65,5-70,9)	82,1 %	71,5 (70,1-72,6)	90,6 %
42		69,3 (64,7-74,8)	84,8 %	70,8 (68,2-73,5)	89,0 %

Die verskille in aktivering van AST aktiwiteit, tussen die twee bepalingsprosedures is nie biologies betekenisvol nie. Aangesien metode B prakties makliker uitvoerbaar is op die outomatiese Gilford sisteem, is hierdie metode vir alle AST aktiwiteit bepalings gebruik.

2.3.4 *Stabiliteit van AST en PLP verbinding tydens periodes van stoor.*

Hierdie eksperiment is uitvoer om die invloed van die in vitro veroudering van eritrosiete onder verskillende toestande, op die AST aktiwiteit te ondersoek.

Die volgende monsters is berei en verouder:

2.3.4.1 Heelbloed alleen

2.3.4.2 Gewasde eritrosiete gesuspendeer in 'n voedings medium.

2.3.4.3 Gewasde eritrosiete gesuspendeer in 'n isotoniese NaCl oplossing.

2.3.4.4 'n Hemolisaatbereiding voordat eritrosiet debrie en membrane verwyder is.

2.3.4.5 'n Volledig bereide hemolisaat.

2.3.4.1 Heelbloed alleen verouder

Gehepariniseerde bloed is versamel en op die laboratorium bank by kamertemperatuur gelaat vir 1,5; 3; 4,5; 6; 7,5 en 27 uur. Na elke tydskuur is die eritrosiete en plasma geskei en hemolisaat berei. Die AST aktiwiteit, met en sonder die byvoeging van PLP, is dan bepaal. Die resultate is statisties verwerk en die regressielyne word in Fig 2.16 grafies voorgestel.

'n Afname in AST aktiwiteit, voor en na die in vitro byvoeging van PLP is oor 'n tydperk van 27 uur waargeneem. Die persentasie aktivering van AST aktiwiteit deur PLP, het egter konstant gebly binne die normale variasie van die bepalingsmetode. Hierdie resultate dui op 'n inaktivering van die

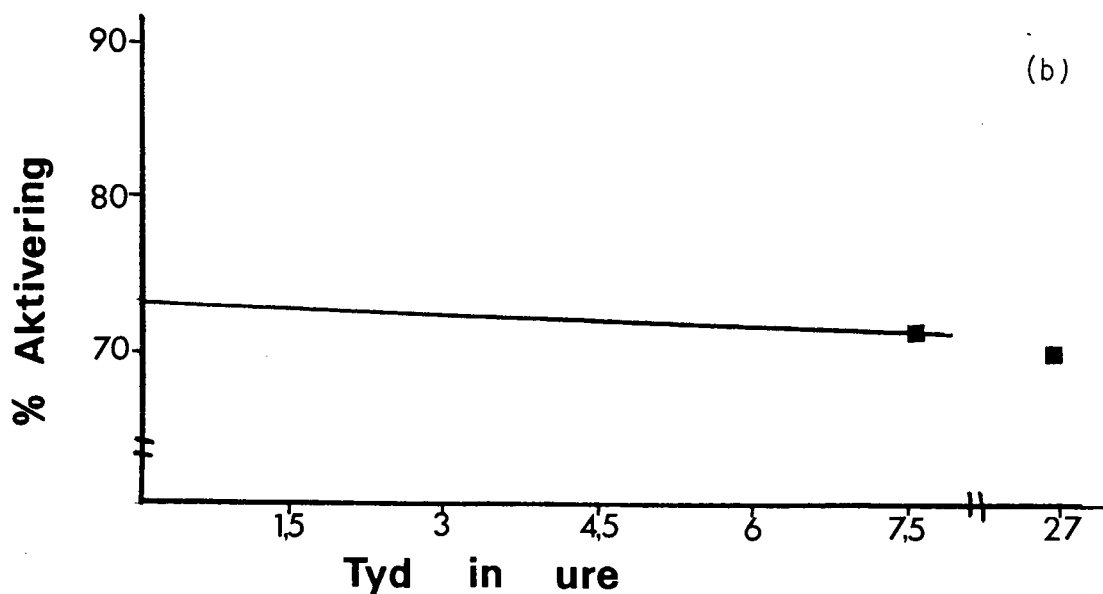
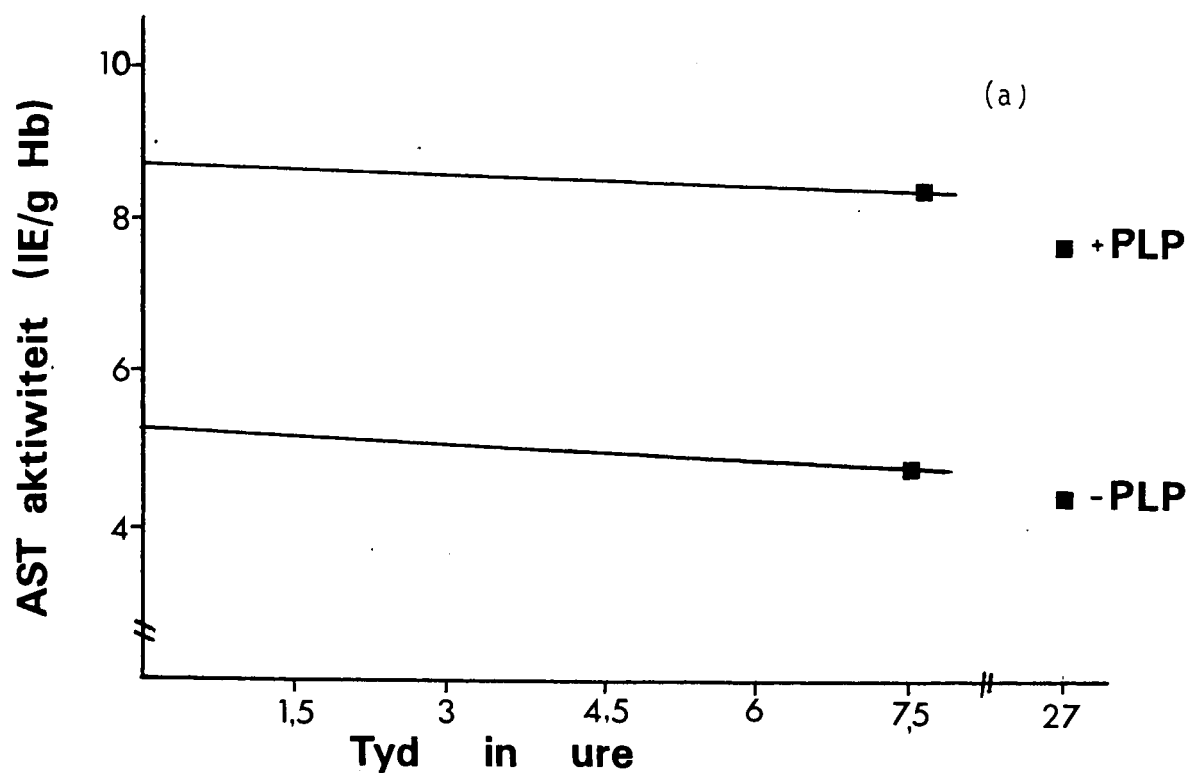


Fig 2.16 Die stabiliteit van die AST-PLP verbinding tydens die veroudering van heelbloed vir verskillende periodes van tyd. Die AST aktiwiteit voor en na die byvoeging van PLP, na verskillende periodes van veroudering van die monsters, word in die boonste grafiek aangetoon. Die persentasie aktivering van AST aktiwiteit na die byvoeging van PLP, word in die onderste grafiek aangetoon.

ensiem, sonder dat PLP konsentrasie in die sel verlore gaan. Dië inaktivering kan verlies van ensiem uit die selle, of die inaktivering van die ensiemstruktuur as sulks, deur die verouderingsproses, behels.

2.3.4.2 Veroudering van gewasde eritrosiete, gesuspendeer in 'n voedingsmedium.

Die plasma van 'n gehepariniseerde bloedmonster is d.m.v. sentrifugering verwyder en die eritrosiete is drie maal met 'n isotoniese NaCl oplossing gewas. Daarna is die gepakte eritrosiete geresuspendeer in die voedingsmedium. Nadat die monster vir tydseenhede van 1,5; 3; 4,5 ; 6; 7,5, en 24 uur by kamertemperatuur gelaat is, is die voedingsmedium deur sentrifugering verwyder. Die hemolisaat bereiding is voltooi en AST aktiwiteit, voor en na die byvoeging van PLP, is bepaal. In fig 2.17 word die resultate grafies as regressielyne voorgestel.

Geen betekenisvolle afname in AST aktiwiteit voor die in vitro byvoeging van PLP kom voor oor 'n tydperk van 24 uur nie. Na die in vitro byvoeging van PLP is daar egter 'n betekenisvolle afname in ensiemaktiwiteit van 10,31 IE/g hemoglobien in die basale monster, tot 8,68 IE/g hemoglobien na 24 uur. Daar is ook 'n drastiese afname in persentasie aktivering van AST aktiwiteit na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium. Hieruit kan afgelei word dat onaktiewe apoensiem uit die selle verloor is tydens die veroudering van die eritrosiete in die voedingsmedium. (Sien Hoofstuk 3).

2.3.4.3 Veroudering van gewasde eritrosiete, gesuspendeer in 'n isotoniese NaCl oplossing.

Hierdie monster is net so behandel soos dië in 2.3.4.2 behalwe dat die eritrosiete in 'n isotoniese NaCl oplossing gelaat is vir die verskillende tye voordat die hemolisaat berei is en die AST aktiwiteit met en sonder die byvoeging van PLP bepaal is. Resultate word in fig 2.18 voorgestel as regressielyne.

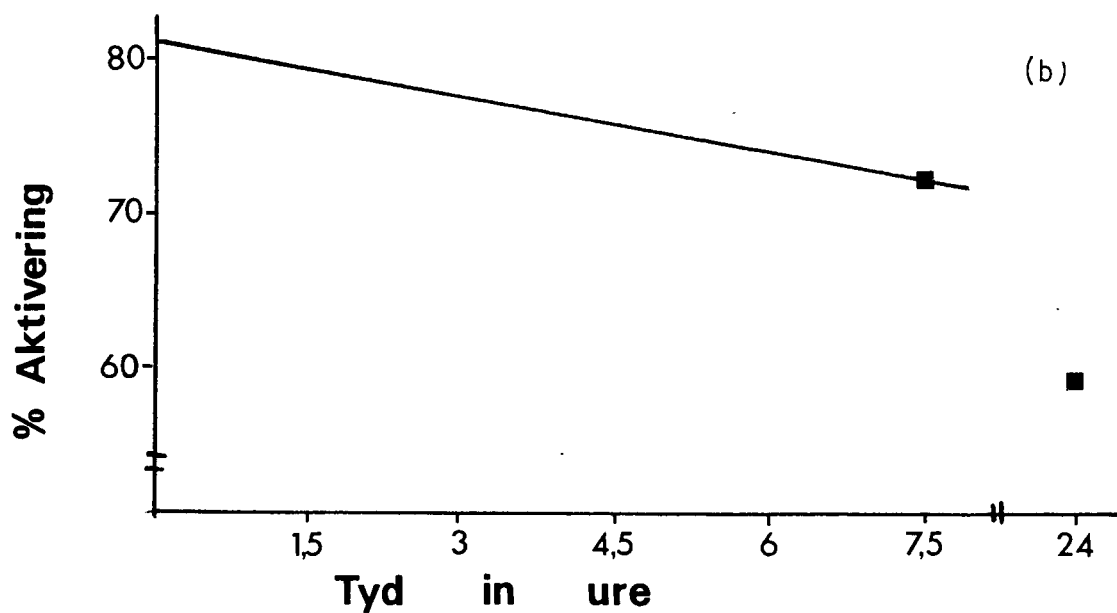
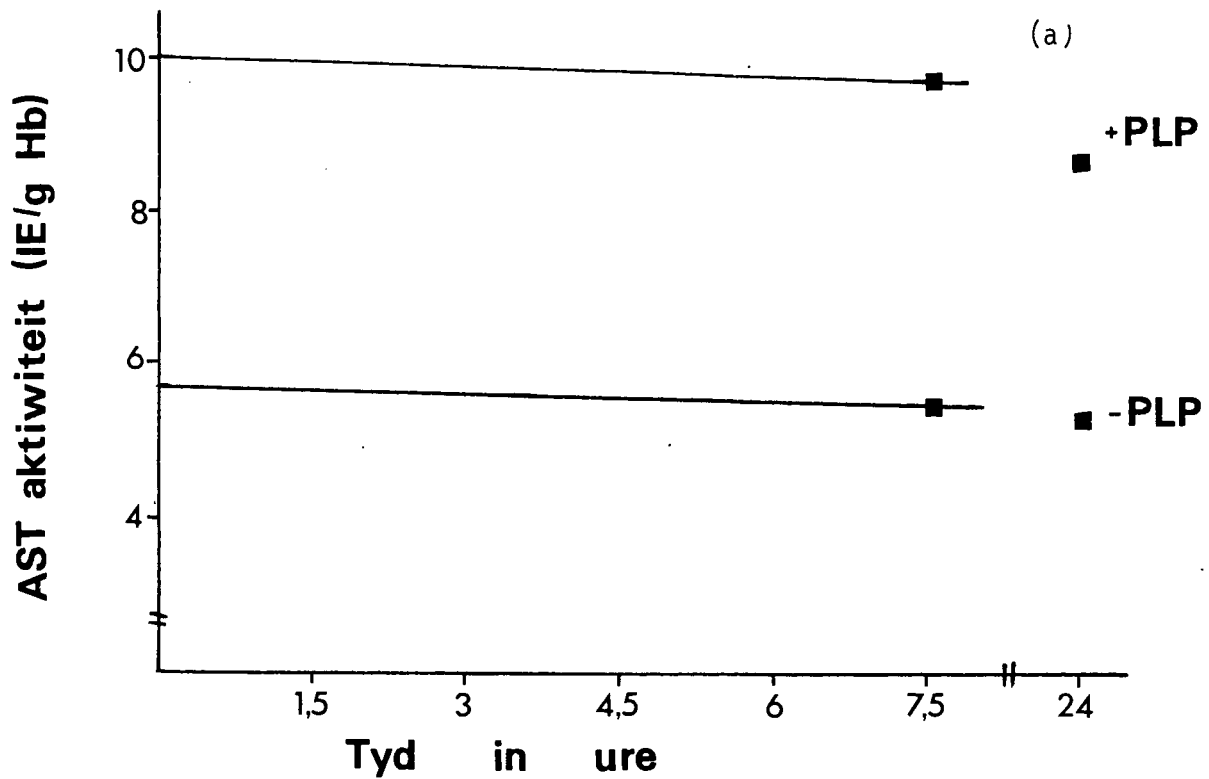


Fig 2.17 Die stabiliteit van die AST-PLP verbinding tydens die veroudering van gewasde eritrosiete, gesuspender in 'n voedingsmedium, vir verskillende periodes van tyd. Die AST aktiwiteit voor en na die byvoeging van PLP, na verskillende periodes van veroudering van die monsters, word in die boonste grafiek en die persentasie aktivering van AST, in die onderste grafiek, aange-
toon.

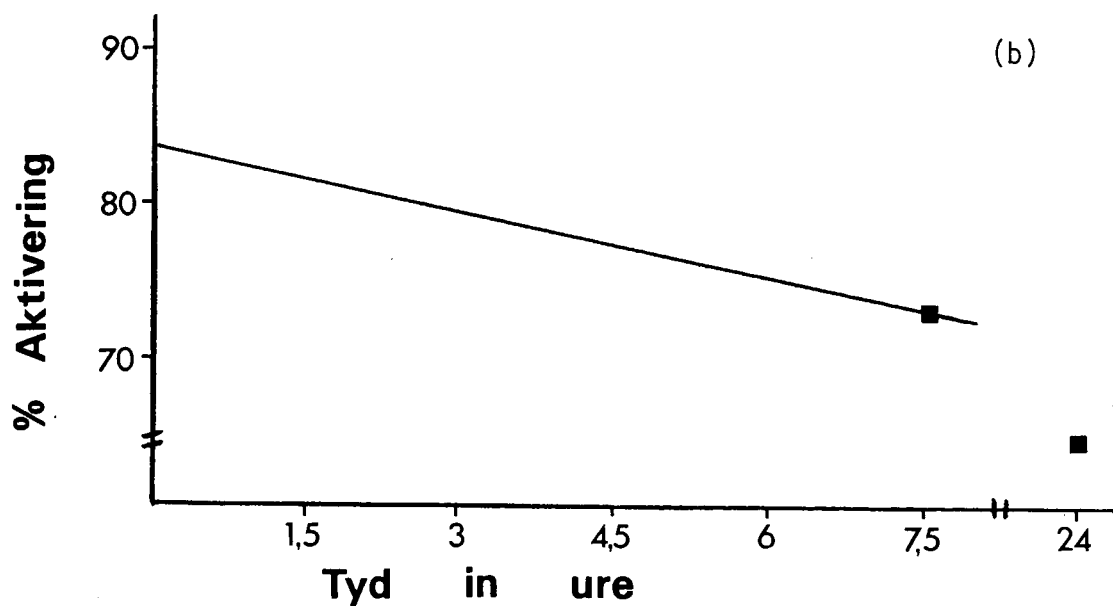
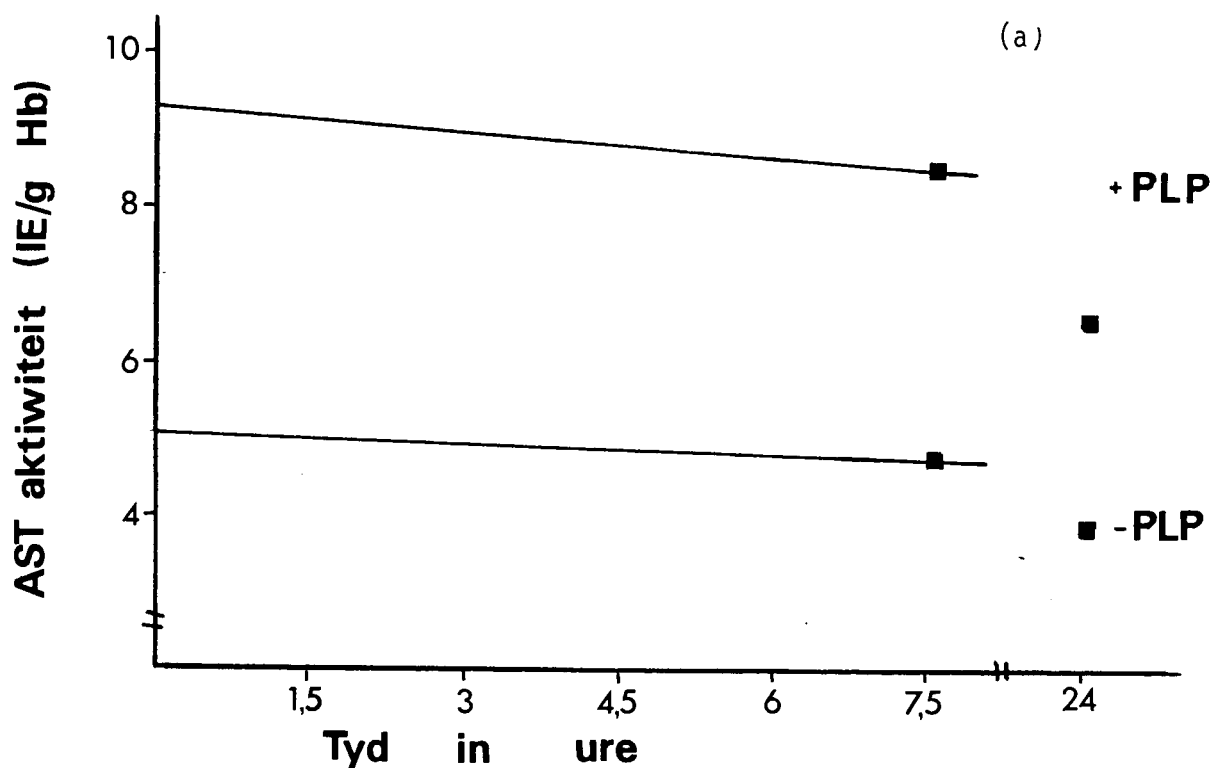


Fig 2.18 Die stabiliteit van die AST-PLP verbinding tydens die veroudering van gewasde eritrosiete, gesuspendeer in isotoniese NaCl, vir verskillende periodes van tyd. Die AST aktiwiteit voor en na die byvoeging van PLP, na verskillende periodes van veroudering van die monsters, word in die boonste grafiek en die persentasie aktivering van AST, in die onderste grafiek, aangetoon.

Tydens die veroudering van eritrosiete in 'n isotoniese NaCl oplossing, is daar 'n afname in AST aktiwiteit, beide voor en na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium, oor 'n tydperk van 24 uur. Die afname in ensiemaktiwiteit is egter meer uitgesproke by dié bepaling na die byvoeging van PLP, soos ook aangedui deur die afname in persentasie aktivering van ensiemaktiwiteit deur PLP. (fig 2.18 b).

Daar is dus 'n verlies van beide aktiewe holoensiem sowel as onaktiewe apoensiem uit die selle tydens die veroudering van die eritrosiete in isotoniese NaCl. Daar is egter 'n groter verlies van die onaktiewe apoensiem uit die selle vanweë die afname in die persentasie aktivering. Dit dui moontlik op 'n beskermingsmeganisme van die sel in die teenwoordigheid van PLP.

2.3.4.4 Veroudering van 'n hemolisaatbereiding in die teenwoordigheid van seldebrie en membrane.

Die hemolisate is onmiddelik nadat die bloed getrek is, berei. Die hemolisate is egter nie verdun en die seldebrie is nie verwyder nie. Die onverdunde hemolisate en seldebrie is dan by kamertemperatuur vir die verskillende tye soos in bogenoemde eksperimente gelaat voordat AST aktiwiteit met en sonder die byvoeging van PLP bepaal is. Resultate word grafies as regressielyn voorgestel in Fig 2.19.

Tydens die veroudering van hemolisate in die teenwoordigheid van seldebrie is daar weer 'n afname in AST aktiwiteit beide voor en na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium. Inaktivering van die ensiemproteïen kom dus voor. Die onaktiewe apoensiem word tot 'n groter mate geïnaktiveer as die holoensiem, soos aangedui deur die afname in persentasie aktivering van AST aktiwiteit deur die byvoeging van PLP. Dit kan voorkom, deurdat die PLP nie 'n beskermende invloed op die apoensiem uitoefen nie en gevolglik word die apoensiem makliker geïnaktiveer. Die uitlek van die ensiem uit die selle is hier nie betrokke nie aangesien die eritrosiet voor die veroudering gehemoliseer word.

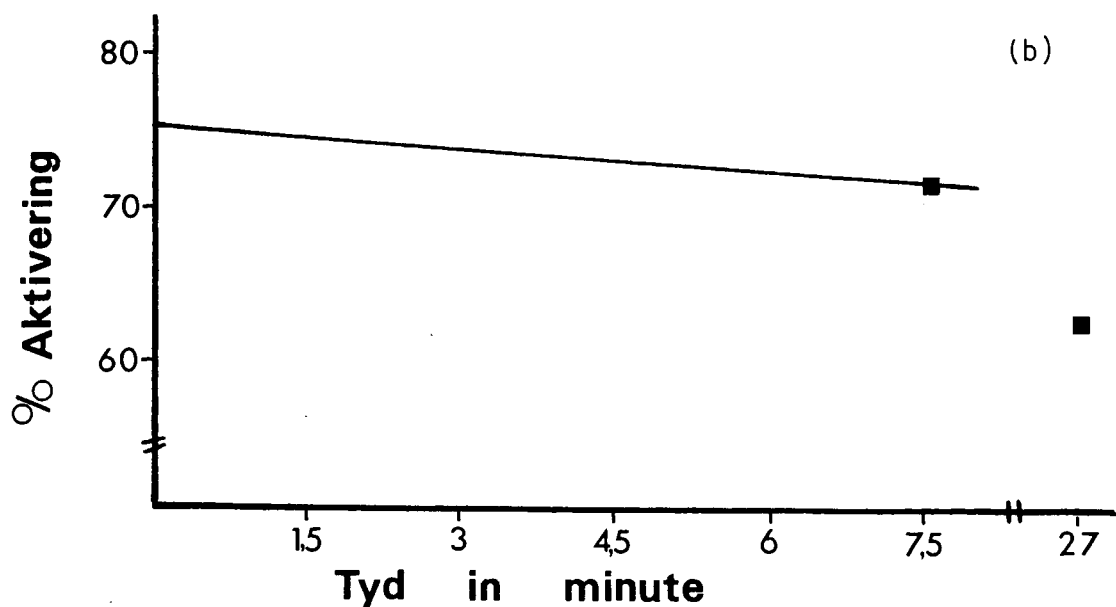
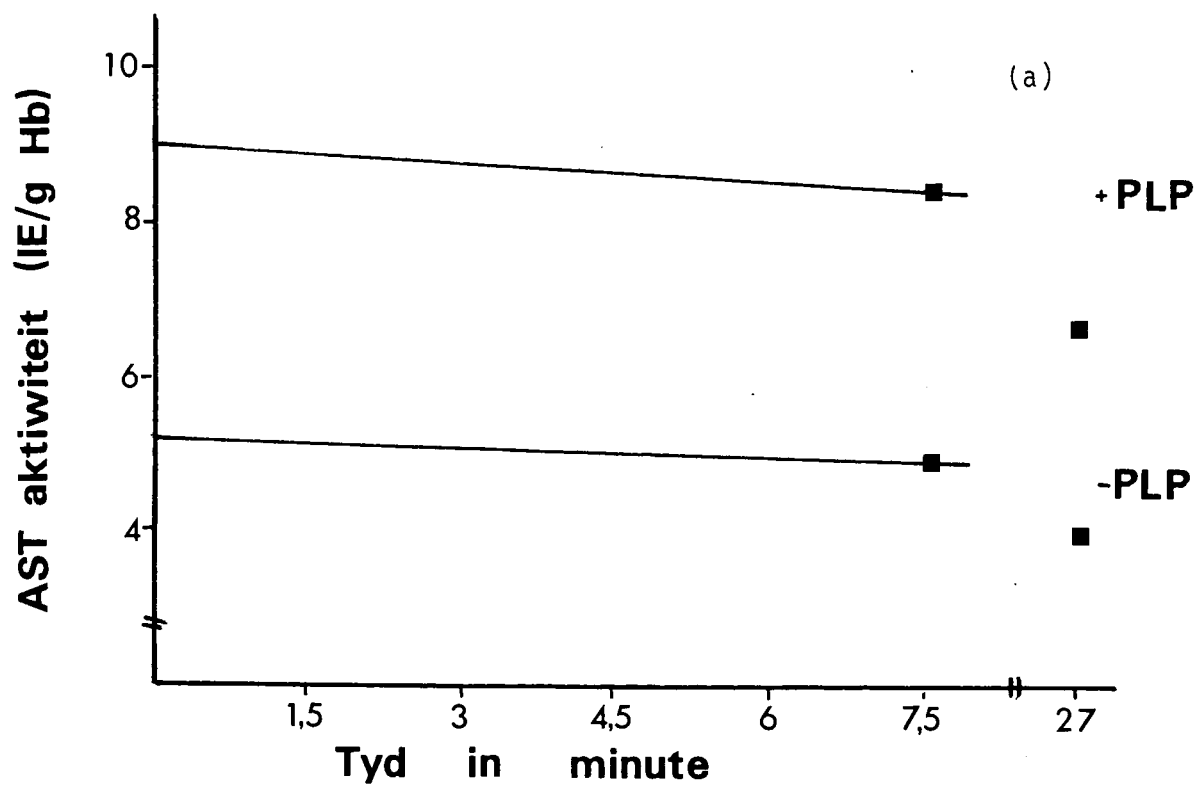


Fig 2.19 Die stabiliteit van die AST-PLP verbinding tydens die veoudering van 'n hemolisaatbereiding, voordat die eritrosiet debrie en membrane verwyder is, vir verskillende periodes van tyd. Die AST aktiwiteit voor en na die byvoeging van PLP, na verskillende periodes van veroudering van die monsters, word in die boonste grafiek, en die persentasie aktivering van AST, in die onderste grafiek, aangetoon.

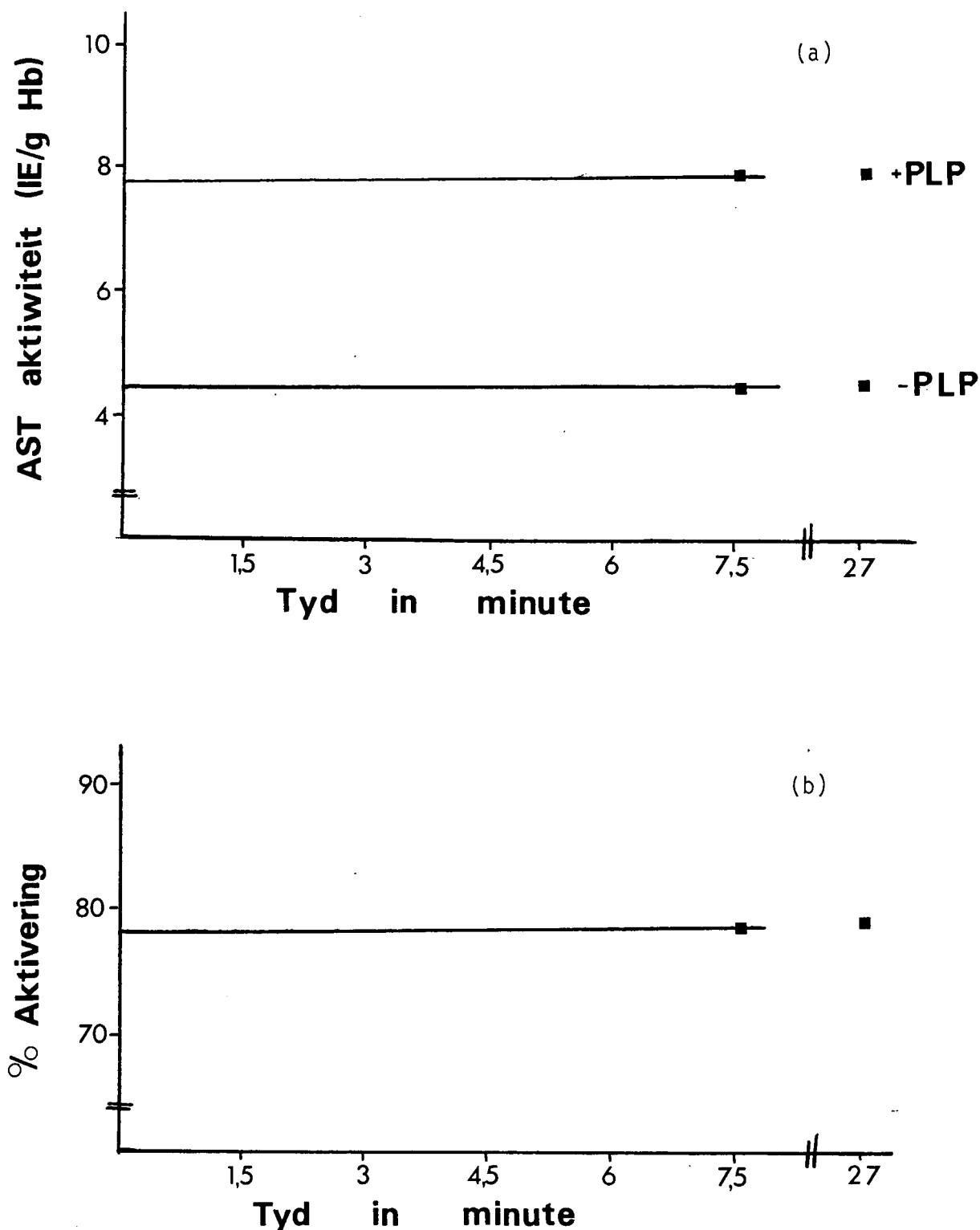


Fig 2.20 Die stabiliteit van die AST-PLP verbinding tydens die veroudering van 'n volledig bereide hemolisaat vir verskillende periodes van tyd. Die AST aktiwiteit voor en na die byvoeging van PLP, na verskillende periodes van veroudering van die monsters, word in die boonste grafiek en die persentasie aktivering van AST, in die onderste grafiek, aangetoon.

2.3.4.5 Veroudering van 'n volledig bereide hemolisaat.

Die hemolisaat is volledig uit gehepariniseerde bloed berei en vir die verskillende tye by kamertemperatuur gelaat. Daarna is AST aktiwiteit met en sonder die in vitro byvoeging van PLP bepaal. Resultate word aangetoon in fig 2.20.

In hierdie eksperiment is die homeostatische regulering van die selle opgehef. 'n Konstante ensiemaktiwiteit oor die verouderingstydperk van 27 uur, binne die variasie vir bepaling met die apparaat, is beide voor en na die in vitro byvoeging van PLP waargeneem.

Samevattend:

Verlies van AST aktiwiteit kom in alle gevalle van veroudering voor, behalwe waar die hemolisaat eers volledig berei is en daarna verouder is. Indien 'n heelbloed monster nie op dieselfde dag waarop dit van die proefpersoon versamel is, geanaliseer kan word nie, skyn dit dus raadsaam te wees om die hemolisaat volledig te berei voordat dit gestoor word vir analisering op 'n latere tydstip.

HOOFSTUK 3

VITAMIEN B₆ DERIVAAT INKUBASIESTUDIES

3.0	Inleiding	73
3.1	Materiaal en methodes	74
3.1.1	Proefpersone en monsterneming	74
3.1.2	Chemikalië	74
3.1.3	Methodes	74
3.2	Resultate	75
3.2.1	Inkubasie van heelbloed met piridoksien en piridoksaal-5'-fosfaat	75
3.2.1.1	Verandering van ensiem aktiwiteit in hemolisate	75
3.2.1.2	Veranderinge in plasma ensiemaktiwiteit....	77
3.2.2	Inkubasie van heelbloed met piridoksien en natriumfloried	79
3.2.3	Inkubasie van eritrosiete in isotoniese NaCl met piridoksien, piridoksaal en piridoksaal-5'-fosfaat...	81

HOOFSTUK 3

VITAMIEN B₆ DERIVAAT INKUBASIE STUDIES3.0 Inleiding

Die ensiem aspartaataminotransferase (AST) benodig piridoksaal-5'-fosfaat (PLP) as koensiem. In die plasma van normale mense sowel as in verskeie siektetoestande, kom die ensiem in beide die onaktiewe apoensiem sowel as aktiewe holoensiem vorm voor. Die bron van die onaktiewe apoensiem in plasma is onbekend aangesien die ensiem in alle organe met uitsondering van die eritrosiet, ten volle versadig skyn te wees. In die volwasse eritrosiet kan tot soveel as die helfte van die totale ensiemproteïen in die onaktiewe apoensiem vorm voorkom. In beide die plasma en in die eritrosiete kan die apoensiem egter maklik geaktiveer word deur die byvoeging van PLP by die bepalingmedium, soos aangedui in die vorige hoofstuk. Die vraag ontstaan dus waarom die apoensiem in vivo in die eritrosiet nie versadig is met sy koensiem, PLP nie.

Anderson en medewerkers [9] het, deur gebruik te maak van tritium gemerkte piridoksien, aangetoon dat die intakte volwasse eritrosiet wel in vitro, piridoksien kan opneem en omskakel na PLP deur die volgende metaboliese weg:

Piridoksien



PIRIDOKSAALKINASE

Piridoksienfosfaat



PIRIDOKSAALFOSFAATOKSIDASE

Piridoksaal - 5'- fosfaat



ALKALIESEFOSFATASE

Piridoksaal

Hierdie navorsers het egter nie die AST aktiwiteit in hierdie eksperimente bepaal om te sien of die PLP so gevorm wel die apoensiem kan aktiveer nie. In hierdie studie is hul inkubasie-eksperimente herhaal om die effek van inkubasie van die volwasse eritrosiet met vitamien B₆ derivate in vitro, op die apoensiem aktivering te bepaal.

3.1 Materiale en Metodes:

3.1.1 *Proefpersone en monsterneming*

Alle eksperimente beskryf in hierdie hoofstuk, is uitgevoer met gehepariniseerde bloed, verkry vanaf slegs een gesonde proefpersoon. Die heelbloedmonster is direk nadat dit geneem is, vir inkubasiestudies gebruik.

3.1.2 *Chemikalië*

Vitamien B₆ derivate, piridoksienmonohidrochloried (PN), piridoksaal-5'-fosfaat (PLP) en piridoksaal HCl, in die kristallyne vorme, is verkry vanaf Sigma, natriumchloried vanaf SAARCHEM en natriumfloried (NaF) vanaf Merck.

3.1.3 *Metodes*

Gehepariniseerde bloed is geïnkubeer met:

- Fisiologies (500 ng/ml bloed) en farmakologiese (295 µg/ml bloed) dosisse PN en PLP
- Fisiologiese dosisse PN en NaF.
- Fisiologiese dosisse PN, PL en PLP is geïnkubeer met eritrosiete waar die plasma vervang is met 'n isotoniese NaCl oplossing.

'n Basale hemolisaat monster, d.w.s. sonder inkubasie met Vitamien B₆ derivate, is direk nadat die heelbloedmonster verkry is, berei. 'n Bekende volume bloed is in 'n buis, afgeskerm van lig met behulp van aluminiumfoelie, gepipetteer en die ooreenstemmende konsentrasie vitamien B₆ derivaat, is bygevoeg. Daarna is die monster in 'n 'Techne Emperor' waterbad by 37°C geïnkubeer terwyl dit aanhoudend geskud is m.b.v.

'n 'Gallenkamp' skudapparaat om voortdurende vermenging van die eritrosiete en vitamien B₆ derivate te verseker. Na periodes van 5, 20, 40 en 60 minute, is 'n bloedmonster uit die buis verwyder. Die plasma is van die eritrosiete geskei d.m.v. sentrifugering teen 3000 r.p.m. by 0°C, waarna dit in 'n ysbak geplaas is. Die gepakte eritrosiete is in 'n koue isotoniese NaCl oplossing gewas, voordat die hemolisate berei is. Al die monsters is op ys gehou, afgeskerm van lig, tot voor die bepaling van AST aktiwiteit.

Gedurende die inkubasie van heelbloed met PN en NaF, is 10 mmol NaF/ℓ bloed vooraf vir 10 minute saam met heelbloed geïnkubeer voordat 500 ng PN/mℓ bloed by die monster gevoeg is en verder, soos reeds bespreek, geïnkubeer is.

In verdere eksperimente is die plasma vervang met 'n isotoniese NaCl oplossing, gedurende die inkubasiestap.

Basale AST aktiwiteit, d.w.s. die ensiemaktiwiteit voor die byvoeging van PLP by die bepalingmedium, is in die plasma en hemolisate gemeet. Die totale aktiwiteit in beide monsters, na die byvoeging van PLP, is ook bepaal. Uit hierdie resultate is die persentasie aktivering bereken. Dit stel die persentasie toename in AST aktiwiteit, geproduseer deur PLP, in die bepalingprosedures voor.

3.2 Resultate

3.2.1 *Inkubasie van heelbloed met Piridoksien (PN) en Piridoksaal-5'-fosfaat (PLP)*

3.2.1.1 Verandering van ensiemaktiwiteit in hemolisate.

Die AST aktiwiteit in die hemolisate na inkubasie van heelbloed met fisiologiese en farmakologiese dosisse PN en PLP word in Figuur 3.1 aangetoon. Die waargenome waardes word voorgestel as regressielyne. Die lyne stel die verskillende waardes verkry sonder (-PLP) en met (+PLP) die byvoeging van PLP by die bepalingmedium voor.

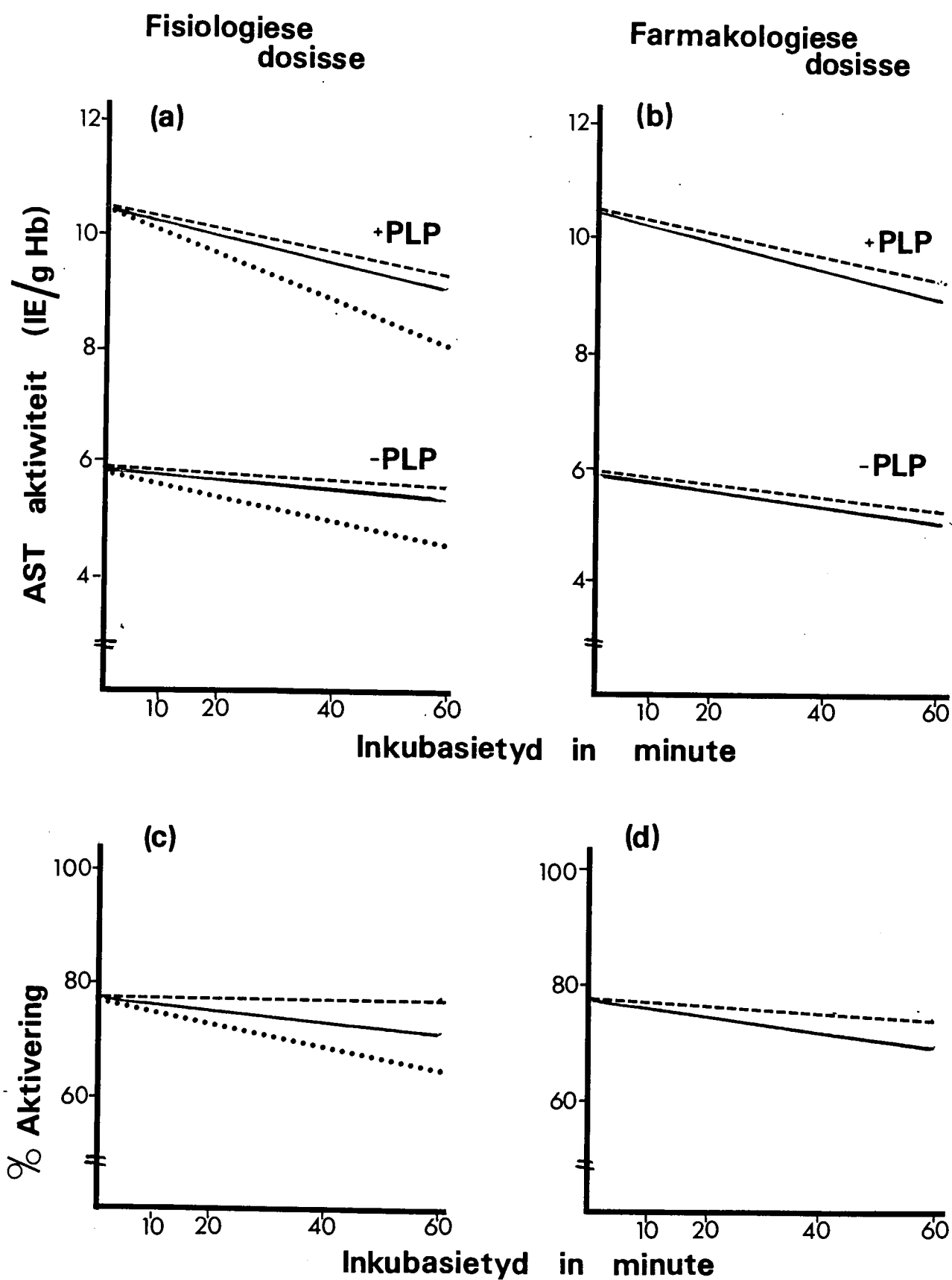


Fig 3.1 Die AST aktiwiteit in die hemolisate na inkubasie van heelbloed met fisiologiese en farmakologiese dosisse PN en PLP asook aktivering van AST aktiwiteit deur PLP in vitro.

Inkubasie van heelbloed met PN : —————→

Inkubasie van heelbloed met PLP : - - - - -

Inkubasie van heelbloed alleen : ·········

'n Afname in AST aktiwiteit met tyd tydens inkubasie van heelbloed met PN en PLP, is waargeneem beide voor en na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium soos aangetoon in Fig 3.1 a en b. Die afname is egter minder uitgesproke in dié bepaling waar geen PLP tydens die AST bepaling, bygevoeg is nie. Dié effek word ook aangetoon waar die resultate uitgedruk word as persentasie aktivering (Fig 3.1 c, d) In die geval waar heelbloed sonder die byvoeging van vitamien B₆ derivate geïnkubeer is, is 'n groter afname in ensiemaktiwiteit beide voor en na in vitro byvoeging van PLP gevind. In hierdie geval is dit egter nie 'n selektiewe verlies nie aangesien die aktivering konstant bly oor sestig minute (Fig 3.1 c). Geen betekenisvolle verskille is aangetoon tussen inkubasie eksperimente met fisiologiese en farmakologiese vitamien konsentrasies nie.

Hierdie bevindings dui op 'n progressiewe verlies van ensiem uit die eritrosiete gedurende die inkubasies met die twee vitamien B₆ derivate. Die afname in persentasie aktivering met tyd stel ook 'n relatiewe groter verlies van apoensiem as holoensiem voor. Die verlies van ensiem tydens inkubasies van heelbloed kan voorkom a.g.v. die in vitro inkubasiestoestand wat moontlik 'n verlies van membraan integriteit tot gevolg het. Die kleiner afname in ensiemaktiwiteit tydens inkubasie van heelbloed met PN en PLP dui op 'n beskermende effek van PN en PLP teen die verlies van die ensiem uit die sel.

3.2.1.2 Veranderinge in plasma ensiemaktiwiteit

In Figuur 3.2 word die AST aktiwiteit in die plasma na inkubasie van heelbloed met PN en PLP aangetoon. Hierdie resultate is vergelyk met AST in normale plasma, sonder inkubasie met PN en PLP.

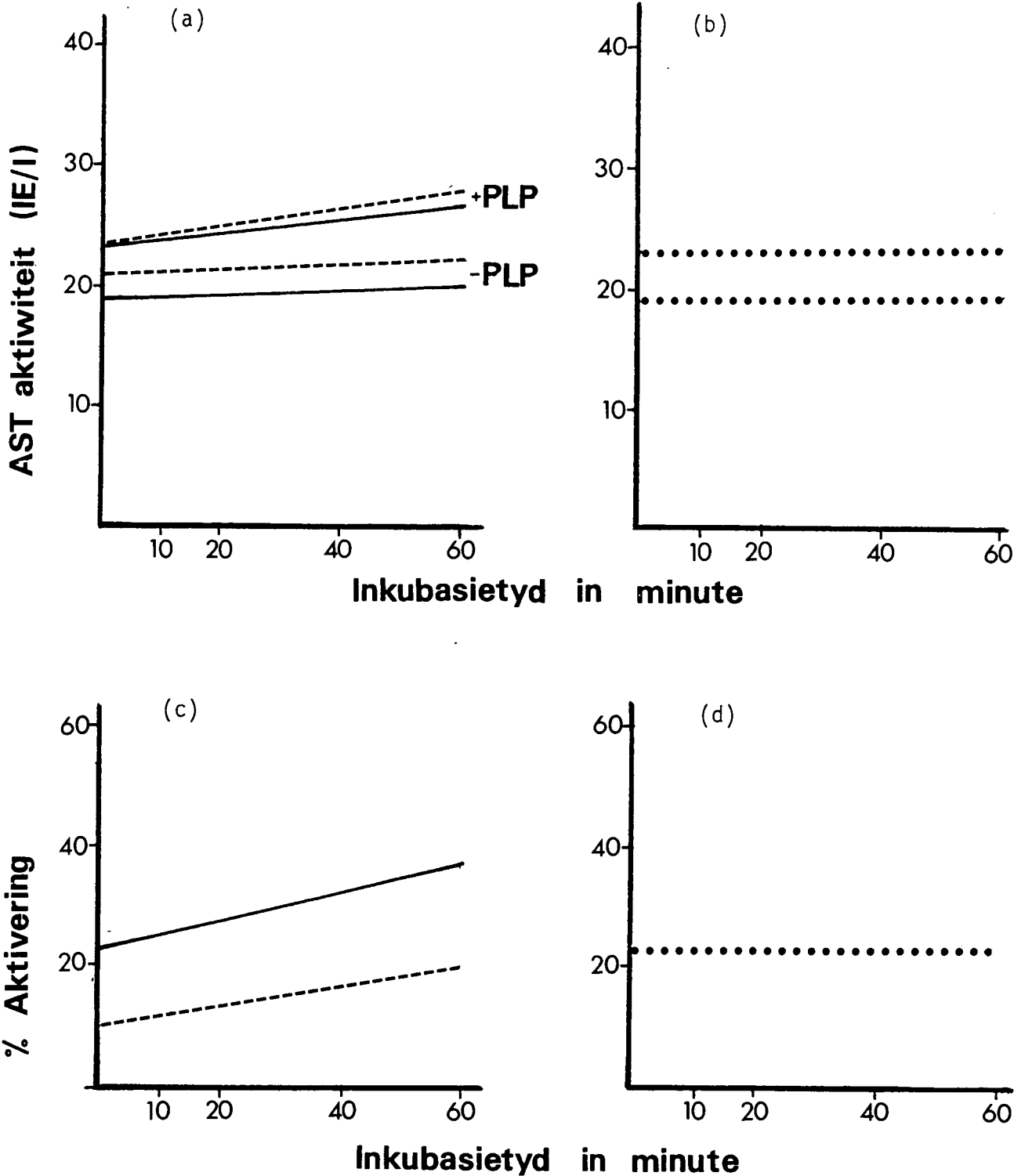


Fig 3.2 Die AST aktiwiteit in die plasma na inkubasie van heelbloed met fisiologiese dosisse PN en PLP, asook die aktivering van AST aktiwiteit deur PLP in vitro.

- Inkubasie van heelbloed met PN : —————
- Inkubasie van heelbloed met PLP : - - - - -
- Inkubasie van heelbloed alleen :

Met die inkubasie van heelbloed met PN en PLP is daar 'n progressiewe toename in AST aktiwiteit in die plasma, beide voor en na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium. Die toename in ensiemaktiwiteit na die byvoeging van PLP is egter groter as voor die byvoeging daarvan. Hierdie verskil word ook weerspieël deur die toename in persentasie aktivering van AST aktiwiteit met tyd.

Dit versterk die argument dat die onaktiewe apoensiem by voorkeur uit die selle lek, gedurende inkubasies van heelbloed met die vitamien B₆ derivate. Die laer persentasie aktivering en hoër basale AST aktiwiteit waargeneem na inkubasie met PLP, kom voor a.g.v. gedeeltelike aktivering van die apoensiem deur PLP gedurende die inkubasie stap, voor die verdere byvoeging van PLP by die bepalingmedium.

3.2.2 *Inkubasie van heelbloed met Piridoksien (PN) en natriumflo-ried (NaF)*

Yamada en Tsuji [115] het gevind dat die opname van PN deur die eritrosiet afneem met lae temperature, hoër pH, versadiging met substrate en die teenwoordigheid van 4'-deoksipiridoksien (4'-DOPN). Op grond van hierdie bevindings is afgelei dat PN met behulp van aktiewe transport deur die eritrosiet opgeneem word. Mehanso en Henderson [110] het van 'n vinnige vermengingstegniek met tritiumgemerkte substrate gebruik gemaak om hierdie stelling te ondersoek. Hulle het gevind dat die eritrosiete, PN deur passiewe diffusie opneem, aangesien die aanvanklike invloed onversadigbaar is en nie geaffekteer word deur piridoksamien, piridoksaal of 4'-DOPN nie.

In hierdie studie is NaF, in die teenwoordigheid van PN, met heelbloed geïnkubeer. NaF inhibeer glikolise. Indien PN deur 'n aktiewe proses deur die eritrosiet opgeneem word, kan die teenwoordigheid van NaF die energievoorsiening vir die vervoermeganisme van PN oor die selmembraan inkort. In fig 3.3 word die resultate van inkubasiestudies van PN en NaF met heelbloed, in hemolisaat en plasma monsters, aangetoon.

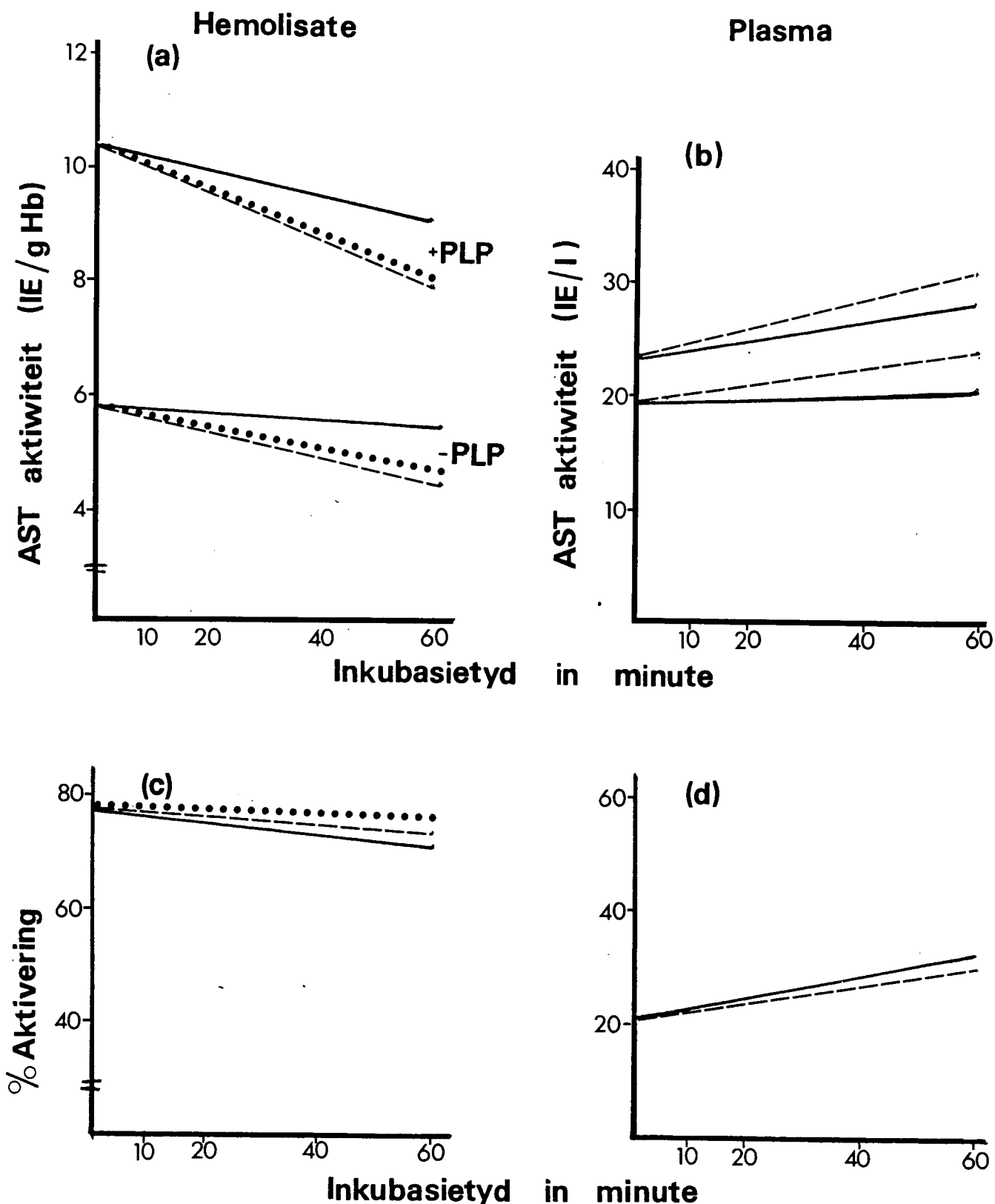


Fig 3.3 Die AST aktiwiteit in die hemolysate en die plasma na inkubasie van heelbloed met PN en PN + NaF, asook die aktivering van AST aktiwiteit deur PLP in vitro.

Inkubasie van heelbloed met PN : —————
 Inkubasie van heelbloed met PN + NaF : - - - - -
 Inkubasie van heelbloed alleen : •••••

Tydens inkubasies van heelbloed met PN in die teenwoordigheid van NaF, word dieselfde neiging gevind as gedurende inkubasies van heelbloed met PN. In die hemolisaat is daar 'n afname in AST aktiwiteit met tyd, beide voor en na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium. Die afname voor die byvoeging van PLP, is ook minder uitgesproke as na die byvoeging van PLP, soos getoon deur die afname in persentasie aktivering van AST aktiwiteit (fig 3.3 c).

In die teenwoordigheid van NaF is daar egter 'n groter afname in ensiemaktiwiteit in vergelyking met inkubasie van heelbloed met slegs PN. Hierdie groter afname stem ooreen met die groter afname in ensiemaktiwiteit tydens inkubasie van heelbloed sonder die byvoeging van enige vitamien B₆ derivate.

Aangesien NaF die energie voorsiening van die sel inhibeer, mag dit aanleiding gee tot die verlies van die eritrosiet selmembraan integriteit. Die ensiem kan dus makliker uit die selle lek ten spyte van die beskermende effek van PN. Die verlies van AST uit die sel is dus groter en stem ooreen met die ekstrasellulêre verlies van die ensiem wanneer heelbloed alleen by 37°C geïnkubeer word.

Die toename in plasma AST stem ook ooreen met die groter verlies van ensieme uit die eritrosiete (fig 3.3 b). Daar is egter steeds 'n selektiewe verlies van apoensiem teenwoordig, wat aangedui word deur die toename in persentasie aktivering van die plasma AST aktiwiteit met tyd (fig 3.3 d)

3.2.3 *Inkubasie van eritrosiete in isotoniese NaCl met PN, PL en PLP.*

Die resultate verkry in eksperimente waartydens plasma vervang is met 'n isotoniese NaCl oplossing, gedurende die inkubasie periode, word aangetoon in Fig 3.4.

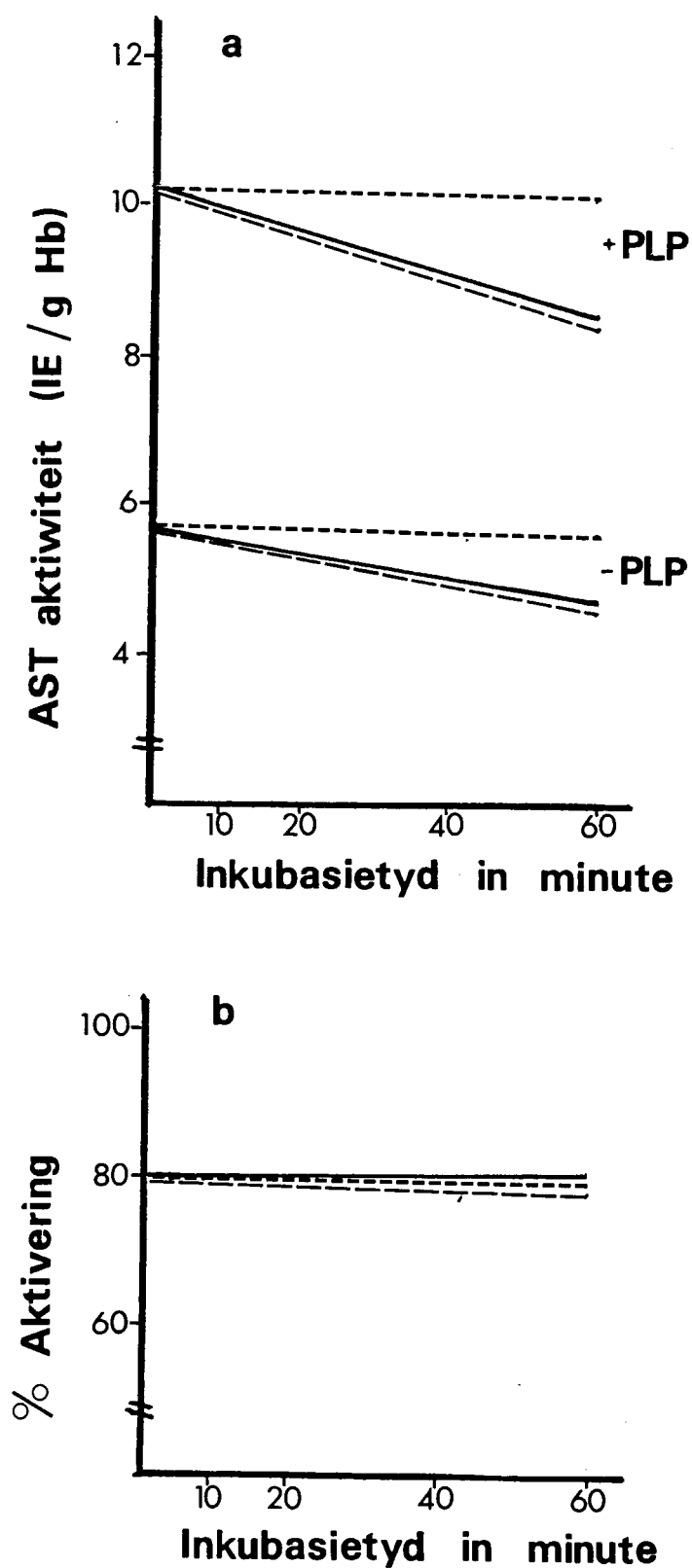


Fig 3.4 Die AST aktiwiteit in die hemolisate na inkubasie van eritrosiete, in 'n isotoniese NaCl oplossing, met PN (————), PL(-----), en PLP(.....), asook die aktivering van AST aktiwiteit deur PLP in vitro.

Gedurende inkubasies van eritrosiete met PN en PL, is daar weereens 'n afname in basale, sowel as totale AST aktiwiteit, in die hemolisaat waargeneem. In hierdie geval is daar skynbaar nie 'n selektiewe verlies van apoensiem nie, aangesien geen veranderinge in persentasie aktivering aangetoon kan word nie. Dit dui moontlik op 'n groter verlies aan eritrosiet integriteit onder hierdie toestande.

Tydens inkubasies van PLP met eritrosiete in die teenwoordigheid van isotoniese NaCl kom daar geen verlies van ensiem uit die selle voor nie (fig 3.4 a). Anderson en medewerkers [9] het aangetoon dat PLP wel deur die eritrosiete opgeneem word as die plasma deur 'n isotoniese NaCl oplossing vervang word. Die gefosforileerde vorme van vitamien B₆ kan egter nie in die teenwoordigheid van plasma deur die eritrosiete opgeneem word nie.

Samevattend

Eksperimentele resultate verkry deur inkubasie studies van eritrosiete met vitamien B₆ derivate kan as volg saamgevat word:

- (i) Geen intrasellulêre aktivering van AST apoensiem kon gedurende hierdie eksperimente aangetoon word nie.
- (ii) 'n Verlies van beide apoensiem en holoensiem uit die eritrosiete kom voor tydens inkubasie van heelbloed by 37°C.
- (iii) Waar heelbloed geïnkubeer is met PN en PLP, kom 'n kleiner verlies van AST uit die eritrosiete voor. Veral apoensiem is tydens hierdie inkubasies verloor.
- (iv) In die teenwoordigheid van isotoniese NaCl, het beide apoensiem en holoensiem uitgelek gedurende inkubasies met PN en PL. PLP skyn hierdie verlies van ensiem op een of ander manier te verhoed, deurdat geen ensiem uit die selle verloor word nie.

- (v) Tydens inkubasies van heelbloed en PN in die teenwoordigheid van NaF, is daar oor die algemeen 'n groter verlies in ensiemaktiwiteit wat ooreenstem met inkubasies van slegs heelbloed. 'n Selektiewe verlies kom egter nog steeds voor.
- (vi) Die verlies van ensiem uit die eritrosiete tydens inkubasie is waarskynlik te wyte aan verlies van membraan integriteit.

Hoewel piridoksien dus volgens Anderson et al [9], die volwasse eritrosiet binnegaan en omgeskakel word na PLP, kon geen intrasellulêre aktivering van apo-AST onder hierdie toestande aangetoon word nie.

HOOFSTUK 4

INVLOED VAN VITAMIEN B₆ INNAME DEUR DIE DIEET OP AST AKTIWITEIT

4.0	Inleiding	86
4.1	Materiaal en metodes	87
4.1.1	Chemikalië	87
4.1.2	Metodes	87
4.1.2.1	Eritrosiet fraksionering	87
4.1.2.2	Bepaling van laktaatdehidrogenase aktiwiteit	89
4.1.2.3	Bepaling van transketolase aktiwiteit	90
4.2	Resultate	92
4.2.1	AST aktiwiteit voor en na addisionele inname van vitamien B ₆ deur die dieet	92
4.2.1.1	AST aktiwiteit in die hemolisate	92
4.2.1.2	AST aktiwiteit in die plasma	96
4.2.1.3	AST aktiwiteit in verskillende eritrosiet fraksies	98
4.2.2	Transketolase aktiwiteit	101
4.2.3	Laktaatdehidrogenase aktiwiteit	101

INVLOED VAN VITAMIEN B₆ INNAME DEUR DIE DIEET OP AST AKTIWITEIT4.0 Inleiding

In die vorige hoofstuk is gemeld, dat hoewel vitamien B₆ in die vorm van PN deur die eritrosiet opgeneem en omgeskakel word na PLP, die PLP so gevorm skynbaar nie beskikbaar gestel word vir aktivering van die onaktiewe apo-AST nie. Krishnaswany [10] het egter 'n verskil in AST vlakke by persone van verskillende sosioekonomiese groepe gevind. Hy het ook aangetoon dat die ensiemaktiwiteit by die mense van die laer sosioekonomiese groep, toegeneem het na vitamien B₆ toediening. Azuma et al [11] het ook met behulp van eritrosiet AST aktiwiteitsbepalings aangetoon, dat 'n daaglikse aanvulling van 50 mg piridoksienhidrochloried (PN HCl), nie alleen die sogenaamde tekort van AST aktiwiteit in gesonde persone regstel nie, maar dat die totale AST aktiwiteit ook toeneem oor 'n periode van 5-11 weke.

Die toename in totale AST aktiwiteit kan voorkom a.g.v. 'n de nova proteïensintese of 'n verminderde proteïen afbraak. Indien dit 'n de nova proteïensintese a.g.v. die verhoogde vitamien B₆ konsentrasie verteenwoordig, ontstaan die vraag of vitamien B₆ algehele proteïensintese induseer en of dit slegs PLP afhanklike ensiemproteïensintese beïnvloed. In hierdie studie is dan die toename in AST aktiwiteit ('n vitamien B₆ afhanklike ensiem) na addisionele inname van vitamien B₆, by normale gesonde mense ondersoek. Die moontlike induksie van algehele proteïensintese a.g.v. 'n verhoogde vitamien B₆ status is ook ondersoek deur gebruik te maak van 'n nie-vitamien afhanklike ensiemmerker naamlik laktaatdehidrogenase (LDH), asook 'n ensiem wat 'n ander vitamien, vir aktiwiteit benodig. In laasgenoemde geval is die aktiwiteit van die ensiem transketolase bepaal wat tiamienpirofosfaat (TPP) of vitamien B₁ as koensiem benodig.

Die geldigheid van die in vitro aktivering van eritrosiet AST met PLP, vir die bepaling van vitamien B₆ voedingstatus, is ook in oorweging geneem.

4.1 Materiaal en Metodes

4.1.1 *Chemikalië*

Chemikalië is van die volgende maatskappye aangekoop:

Merck : Tris (hidroksimetiel) aminmetaan; kaliumchloried; sukrose; piruvaat; perchloorsuur en trietanolamien.

Sigma : Nikotienamiedadeniendinukleotiedfosfaat en Nikotienamiedadeniendinukleotied in die gereduseerde vorm.

SAARCHEM : Natriumchloried

Hickman en Kleber : Kaliumdichromaat

BDH Chemiese Maatskappy : Tiamienpirofosfaat en swaelsuur.

4.1.2 *Metodes*

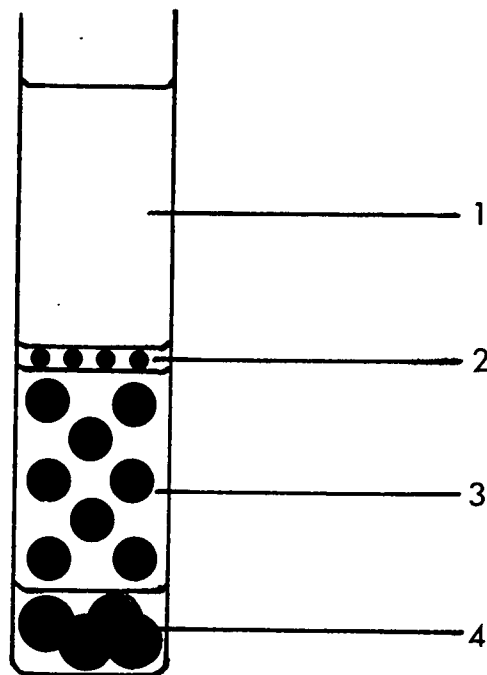
4.1.2.1 Eritrosiet fraksionering

Die reagentse gebruik vir die fraksionering van eritrosiete in jong en ou selle, is as volg:

- (i) 154 mmol/l NaCl (isotoniese natriumchloried)
- (ii) Dekstraan A : 30 g/l dekstraan in 154 mmol/l NaCl
- (iii) Dekstraan B : 270 g/l dekstraan en 0,1 M NaCl, 0,022M KCl en 0,008 M sukrose. Die oplossing is m.b.v. 'n versadigde NaHCO₃ oplossing tot 'n pH van 7,1 gebring.

Tien milliliter gehepariniseerde bloed is van elke proefpersoon verkry. Die plasma is van die eritrosiete geskei d.m.v. sentrifugering met 'n Sorvall sentrifugeerapparaat teen 3 000 rpm vir vyf minute in 'n SM 24 rotor. Die gepakte eritrosiete is in 6 ml dekstraan A gesuspendeer en vir 30 minute by kamertemperatuur gelaat om te sedimenteer. Die

eritrosiete sak dan af na die bodem van die buis en die neutrofiele, eosinofiele, monosiete, limfosiete, basofiele en plaatjies bly in suspensie. Die dekstraan is verwyder en weggegooi waarna die eritrosiete drie maal in 'n koue isotoniese NaCl oplossing gewas is. Twee ml gepakte selle is in 5 ml isotoniese NaCl opgeneem en versigtig op 10 ml dekstraan B oplossing geplaas. Sentrifugering vir twintig minute teen 20 000 rpm met 'n TI kop in 'n Beckman L5-65 ultrasentrifuge by 4°C lei tot die vorming van vier lae nl.



1. 'n Boonste laag isotoniese NaCl wat met 'n pasteur pipet verwyder en weggegooi is.
2. 'n Tweede laag wat 'n fyn suspensie retikulosiet ryke, lae digtheids eritrosiete bevat.
3. 'n Derde laag met 'n digter suspensie lae digtheids eritrosiete (jong eritrosiete).
4. 'n Onderste laag met gepakte hoë digtheids eritrosiete (ou eritrosiete).

Die verskillende lae is versamel en 4-5 maal met koue isotoniese NaCl gewas totdat 'n helder was oplossing verkry is. 'n Gelyke volume van die oorspronklike plasma is by elke monster gevoeg en retikulosiet tellings van elke monster is bepaal m.b.v. kleuring met metileenblou, volgens 'n die metode van Dacie [120].

Retikulosiet tellings het gevarieer van 9,6 % in die retikulosietryke fraksie, tot 2,2-3,3 % in die lae digtheidsfraksie en 0,6-0,9 % in die hoë digtheidsfraksie. Vir bereiding van hemolisate vir AST aktiwiteitsbepaling is die tweede en derde laag saamgevoeg en beskou as jong eritrosiete. Die onderste laag is as die ou eritrosietfraksie beskou. Hemolisate is berei volgens die metode bespreek in hoofstuk 2.1.2 AST aktiwiteitsbepalings voor en na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium is op beide hemolisaatfraksies gedoen.

4.1.2.2. Bepaling van laktaatdehidrogenase (LDH) aktiwiteit.

LDH kataliseer die laaste stap in die anaerobiese glikolitiese baan [60]. Piruvaat word gereduseer om L-laktaat te lewer, terwyl NADH geoksideer word na NAD^+ . Die reaksie is omkeerbaar met 'n ewewigskonstante van 1. Die reaksie verloop dus as volg:



Die volgende reagentiese is gebruik vir die bepaling van LDH aktiwiteit:

- (i) 'n Voorraad Tris buffer in 'n konsentrasie van 0,5 M en 'n pH van 7,4.
- (ii) 'n Werksbuffer berei uit die voorraadbuffer in 'n konsentrasie van 0,058 M Tris.
- (iii) 5,7 mM NADH in buffer (ii)
- (iv) 16,6 mM piruvaat in buffer (ii)

Die werksreagens bestaan uit 27 ml van die werksbuffer, 1 ml NADH oplossing en 2 ml piruvaat oplossing, sodat daar 'n finale konsentrasie van 58 mM Tris; 0,184 mM NADH en 11,4 mM piruvaat in die reaksiekuvet teenwoordig is.

Die LDH aktiwiteit in die bereide hemolisate, is bepaal met behulp van die Gilford outomatiese ensiemanaliseerder wat werk op die beginsel soos reeds beskryf. Daar is gebruik gemaak van die algemene kinetiese program, geprogrammeer vir 'n enkelreagens, 'n monstervolume van 50 μ l en 'n reagensvolume van 1,5 ml asook 'n inkubasietyd van 15 sekondes en 'n leestyd van 30 sekondes, sonder enige preinkubasie periode. As blanko monster is 'n 102 mM $K_2Cr_2O_7$ oplossing waarby 4 druppels gekonsenteerde H_2SO_4 gevoeg is gebruik.

4.1.2.3 Bepaling van Transketolase (TK) aktiwiteit.

Transketolase aktiwiteit in die eritrosiet, is met en sonder die byvoeging van tiamienpirofosfaat (TPP), die koënsiem van TK, deur 'n gemodifiseerde metode van Van Zanten et al [121] bepaal. Dit behels die ensiematiese bepaling van glukose-6-fosfaat, die finale produk van die transketolase reaksies nadat die reaksie met perchloorsuur gestop is. Die glukose-6-fosfaat word bepaal deur die volgende ensiematiese reaksie:



Reagense waarvan gebruik gemaak is:

1. 16 mmol/l Ribose 5-fosfaat.
2. 2 mmol/l Glukose-6-fosfaat as standaard oplossing
3. 'n Tris buffer oplossing in 'n konsentrasie van 0,2 mmol/l met 'n pH van 7,5 waarby 1,2 mmol/l Mg^{2+} gevoeg is.
4. Tiamienpirofosfaatchloried in 'n konsentrasie van 2,0 mmol/l.
5. 1,8 mmol/l Perchloorsuur.
6. Trietanolamien buffer oplossing met 'n konsentrasie van 0,4 mol/l en 'n pH van 7,6.
7. NADP dinatrium sout
8. Glukose-6-fosfaat dehidrogenase, 140 IE/mg en 'n konsentrasie van 5 mg/ml
9. Die werksreagens vir die glukose-6-fosfaat bepaling bestaan uit 0,1 ml glukose-6-fosfaat dehidrogenase en 60 mg $NADP^+$ in 50 ml trietanolamien buffer.

Hemolisate is berei deur die gepakte eritrosiete driemaal in 'n isotoniese NaCl oplossing te was. Die eritrosiete is gehemoliseer deur die byvoeging van Trisbuffer tot op die heelbloed volume, en die monsters oornag te vries. Na ontvriesing is die seldebrie verwyder deur sentrifugering vir 10 minute teen 3 500 rpm. Geen verdunnings is gemaak nie.

Elke hemolisaat is in viervoud met en in viervoud sonder die byvoeging van TPP geïnkubeer. Daardeur is toegelaat vir duplikaat glukose-6-fosfaatbepalings met en sonder TPP na 40 en 60 minuut inkubasies.

Gelyke volumes (0,2 ml) hemolisaat en koensiem is vir 10 minute by 37°C geïnkubeer. In 'n paralelle eksperiment is die TPP met Trisbuffer vervang. Die reaksie is begin deur die byvoeging van 0,4 ml ribose-5-fosfaat by al die monsters. Na 40 en 60 minute is die reaksie gestop deur die presipitering van die proteïne met 0,4 ml perchloorsuur. Na 'n verdere 10 minute by kamertemperatuur, is die buise in 'n koue sentrifugeerapparaat vir 15 minute teen 4 250 rpm gesentri-fugeer om die proteïne te verwyder. Glukose-6-fosfaat in die supernatant is met behulp van 'n Unicam SP 1700 ultraviolet

spektrofotometer bepaal deur 0,1 ml monster by 0,9 ml werksreagens (9) te voeg en die verloop van die reaksie oor vier minute by 340 nm te volg.

Transketolase aktiwiteit is deur die volgende vergelyking bereken:

$$\frac{\text{Absorbansie } 60' - \text{Absorbansie } 40'}{\text{Absorbansie standaard}} \times \text{konsentrasie standaard} \times$$

(mmol/l)

$$\frac{1000}{20}$$

$$20$$

$$= \text{IE/l} \times \frac{68 \text{ g hemoglobien}}{\text{hemoglobienkonsentrasie}}$$

$$= \text{IE/mmol/hemoglobien}$$

4.2 Resultate

4.2.1 *AST aktiwiteit voor en na addisionele inname van vitamien B₆ deur die dieet.*

Gehepariniseerde bloed van 7 normale kontroles is op drie opeenvolgende dae versamel. AST aktiwiteit voor en na die in vitro byvoeging van PLP tydens die bepalings prosedures, is in beide die plasma en bereide hemolisate bepaal. Na dié basale AST aktiwiteitsbepalings het elke persoon 100 mg piridoksienhydrochloried (PN HCl) per dag ingeneem. Na 'n periode van vier weke is gehepariniseerde bloed weer op drie opeenvolgende dae van elke persoon versamel en is AST aktiwiteit en aktivering na byvoeging van PLP in vitro weer bepaal.

4.2.1.1 AST aktiwiteit in die hemolisate.

In figuur 4.2 word die resultate van die bepaling van AST aktiwiteit in die hemolisate, berei voor en na die addisionele inname van vitamien B₆ in die dieet, aangetoon:

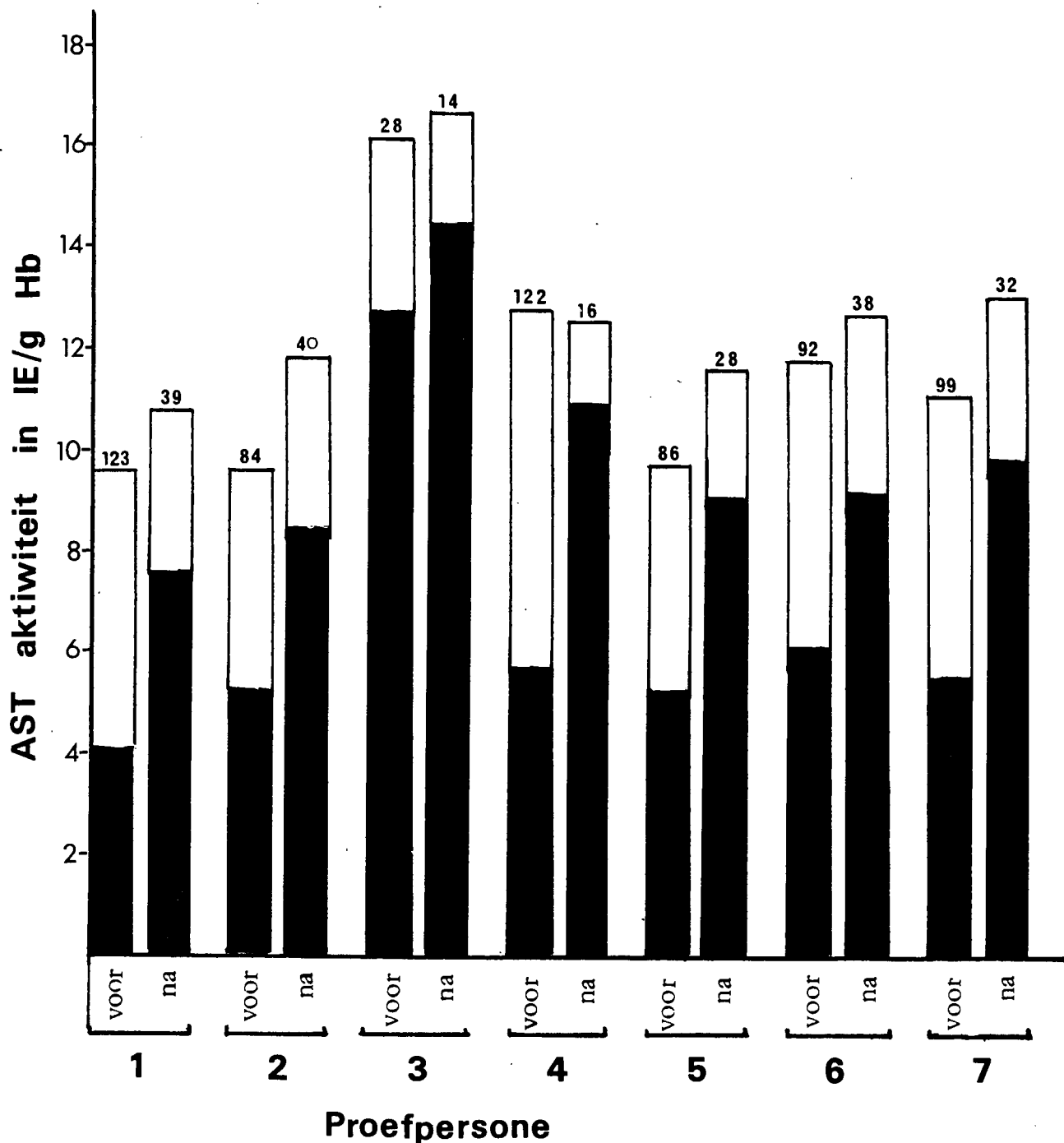


Fig 4.2 AST aktiwiteit in die hemolisate, voor en na die addisionele inname van vitamien B₆ in die dieet. Die donker deel van elke kolom weerspieël die basale, en die ligte deel, die totale AST aktiwiteit, na die in vitro byvoeging van PLP tydens die bepaling van AST. Die persentasie aktivering van AST aktiwiteit na die in vitro PLP byvoeging, word bo-op elke kolom aangedui.

Die linkerkantste kolom van elke paar in Figuur 4.2, toon die AST aktiwiteit voor die gereelde vitamien B₆ inname en die regterkantste kolom in die paar, die AST aktiwiteit nadat vitamien B₆ vir 4 weke ingeneem is. In elke kolom word die AST aktiwiteit voor (die donker gedeelte) en na die in vitro byvoeging van PLP aangetoon, asook die persentasie aktivering van AST aktiwiteit deur die byvoeging van PLP.

By al die persone het die persentasie aktivering van AST aktiwiteit deur die in vitro byvoeging van PLP afgeneem, na die gereelde inname van vitamien B₆. Dit dui daarop dat 'n groter persentasie van die ensiem in die aktiewe holoensiem vorm voorkom na die addisionele inname van vitamien B₆. In geen geval is die teenwoordigheid van die onaktiewe apoensiem in die hemolisaat opgehef nie.

In tabel 4.1 word die toename in basale AST aktiwiteit, sowel as totale AST aktiwiteit, voor en na die addisionele vitamien B₆ inname aangetoon. Die basale AST aktiwiteit (d.w.s. sonder die byvoeging van PLP by die bepalingmedium) het in 6 uit die 7 gevalle toegeneem met tussen 50 en 88 %. In een geval (persoon 3) het die persoon reeds voor die aanvang van die proef op 'n ongereelde basis vitamien B₆ addisioneel tot die dieet ingeneem. By hierdie persoon is slegs 'n toename van 15 % in basale AST aktiwiteit waargeneem, maar die apoensiem was steeds nie versadig met die aktiewe vitamien nie.

'n Toename in totale AST aktiwiteit (d.w.s. na die byvoeging van PLP by die bepalingmedium) van 8-24 % is by vyf persone waargeneem. Hierdie toename in totale AST aktiwiteit dui as 'n verhoging in die konsentrasie van die aktiewe ensiemproteïen intrasellulêr. Die AST aktiwiteit by die persoon wat vooraf reeds vitamien B₆ ingeneem het 'n toename in totale aktiwiteit van slegs 2.7 % getoon. 'n Tweede persoon in die groep het kortisol vervangingsterapie ontvang en het geen styging in totale AST aktiwiteit getoon nie.

TABEL 4.1

Toename in basale AST aktiwiteit (.'.-PLP) nadat Vitamien B₆ addisioneel tot dieet ingeneem is.

	AST aktiwiteit voor Vit. B ₆ inname (IE/g Hb)	AST aktiwiteit na Vit B ₆ inname (IE/g Hb)	% Toename
Persoon 1	4,11	7,69	87,1 %
2	5,26	8,51	61,8 %
3	12,73	14,57	14,5 %
4	5,76	10,81	87,7 %
5	5,26	9,12	28,0 %
6	6,11	9,16	49,9 %
7	5,57	9,83	76,5 %

Toename in totale AST aktiwiteit (.'.+PLP) nadat Vitamien B₆ addisioneel tot dieet ingeneem is.

	AST aktiwiteit voor Vitamien B ₆ inname (IE/g Hb)	AST aktiwiteit na Vitamien B ₆ inname (IE/g Hb)	% Toename
Persoon 1	9,60	10,71	11,6 %
2	9,60	11,91	24,0 %
3	16,17	16,60	2,7 %
4	12,78	12,56	-
5	9,80	11,67	19,1 %
6	11,71	12,68	8,3 %
7	11,08	12,98	17,1 %

4.2.1.2 AST aktiwiteit in die plasma

Sauberlich et al [6] het gevind dat vitamien B₆ in 'n betekenisvol hoër konsentrasie in die serum as in leukosiete en eritrosiete voorkom. Die sensitiwiteit van serum AST vir vitamien B₆ tekort is skynbaar heelwat laer as die sensitiwiteit van die eritrosiet AST daarvoor.

In tabel 4.3 word die plasma AST aktiwiteit, op verskillende dae voor, sowel as verskillende dae na, die addisionele inname van vitamien B₆ deur die dieet, aangetoon.

Na die addisionele inname van vitamien B₆, op 'n daaglikse basis vir 'n periode van vier weke, is 'n afname in die aktivering van ensiemaktiwiteit van + 50 % in die plasma gevind. Die intra individuele variasie van dag tot dag, het ook afgeneem vanaf 5,0-16,5 % (-PLP) en 8,7-27,0 % (+PLP) voor die daaglikse inname van vitamien B₆ tot 1,7-8,7 % (-PLP) en 0,4-7,0 % (+PLP) nadat vitamien B₆ addisioneel ingeneem is. Die interindividuele variasie het egter toegeneem van 20,3 (-PLP) en 13,5 (+PLP) tot 25,0 (-PLP) en 25,1 (+PLP). Daar is nie 'n goeie kontrole uitgeoefen op die tyd van die dag wat die proefpersone die vitamien B₆ gedrink het nie. Alhoewel die bloed altyd in die oggend vroeg getrek is dui hierdie interindividuele variasie net daarop dat die persone die tablette op verskillende tye ingeneem het en diensooreekomstig het die PLP konsentrasies in die plasma gevarieer.

Die gemiddelde AST aktiwiteit van die sewe persone voor die byvoeging van PLP tydens die bepalingprosedures, het toegeneem van 18,5-21,6 IE/ℓ maar na die byvoeging van PLP het die ensiemaktiwiteit dieselfde gebly, beide voor en na die addisionele inname van vitamien B₆. Die afleiding is egter slegs geldig as die groep as geheel beskou word en nie by individuele persone nie.

TABEL 4.3

AST aktiwiteit in die plasma voor en na addisionele inname van vitamien B₆
(IE/ℓ)

	Voor -PLP	+PLP	% Akt	Na -PLP	+PLP	% Akt
Persoon 1	19,4 (18,0-21,0)	25,0 (23,1-28,2)	28,9 %	18,8 (18,0-19,2)	21,1 (20,7-21,4)	12,2 %
V.	7,7 %	11,1 %		3,7 %	1,7 %	
Persoon 2	16,8 (14,8-19,0)	22,0 (20,9-24,2)	30,9 %	20,5 (20,1-20,8)	23,8 (23,7-23,9)	16,1 %
V.	12,5 %	8,7 %		1,7 %	0,4 %	
Persoon 3	25,3 (23,9-26,4)	31,1 (28,1-35,3)	22,9 %	23,6 (22,9-24,2)	26,7 (24,9-27,7)	13,1 %
V.	5,0 %	12,1 %		2,8 %	5,9 %	
Persoon 4	14,9 (13,1-15,6)	21,5 (17,6-26,1)	44,3 %	14,5 (14,2-14,9)	16,9 (16,1-17,7)	16,6 %
V.	10,8 %	19,9 %		2,4 %	4,7 %	
Persoon 5	14,9 (13,9-16,9)	23,7 (17,8-30,5)	59,1 %	18,9 (18,5-19,2)	23,7 (21,9-25,2)	25,4 %
V.	11,5 %	27,0 %		2,0 %	7,0 %	
Persoon 6	21,0 (18,6-25,0)	28,2 (25,2-32,3)	34,3 %	31,7 (30,2-33,3)	37,1 (35,7-39,8)	17,0 %
V.	16,5 %	13,1 %		4,9 %	6,2 %	
Persoon 7	17,0 (14,9-18,8)	25,7 (21,4-29,1)	51,2 %	23,1 (21,0-25,0)	24,9 (23,6-26,1)	7,8 %
V.	11,6 %	15,3 %		8,7 %	5,0 %	
Groepsgem.	18,5	25,3	36,8 %	21,6	24,9	15,3 %
V.	20,3 %	13,5 %		25,0 %	25,1 %	

4.2.1.3 AST aktiwiteit in verskillende eritrosiet fraksies

Die eritrosiete van 'n heelbloedmonster is in ou en jong eritrosiete geskei volgens die metode beskryf in 4.1.2.1. In figuur 4.3 word die hemolisaat AST aktiwiteit sowel as die aktivering van AST aktiwiteit in die verskillende eritrosiet fraksies van persone wat reeds vir vier weke vitamien B₆ daaglik addisioneel ingeneem het (groep 1) aangetoon. Heelbloed van persone wat op 'n normale daaglikse dieet was en geen addisionele vitamien B₆ ingeneem het nie is ook in ou en jong eritrosiete gefraksioneer (groep 2). AST aktiwiteit en persentasie aktivering met PLP is in elke fraksie bepaal en die resultate word in fig 4.4 aangetoon.

In beide groepe was die ensiem in die jong selfraksie tot 'n groter mate versadig met PLP as in die ou selfraksie. Die persentasie aktivering van ensiemaktiwiteit met PLP in die jong selfraksie is heelwat laer as in die ou selfraksie. Een persoon (persoon 4) wat op kortisolbehandeling was het in beide fraksies ongeveer dieselfde mate van versadiging van die ensiem met PLP getoon. By persoon 3 wat op 'n semi-gereelde basis vitamien B₆ ingeneem het, voor die gereelde inname daarvan, was die AST aktiwiteit in die jong selfraksie ten volle versadig met PLP.

Die persentasie aktivering van die ensiem in beide die ou en jong- selfraksie was groterby dié mense in groep 2 as dié in groep 1. Dit dui daarop dat die ensiem by dié mense in groep 1, tot 'n groter mate versadig is met sy koensiem PLP, as by die mense in groep 2.

Aangesien die skeiding van die ou en jong selle relatief was, kan geen definitiewe afleiding gemaak word oor die verskille in totale AST aktiwiteit tussen die twee groepe selle nie. Dit lyk egter of die jong selle oor die algemeen 'n hoër AST aktiwiteit het as die ou eritrosiete. In groep 1 is ook oor die algemeen 'n hoër AST aktiwiteit in beide die ou en die jong eritrosiete as in groep 2, waargeneem. Dit lyk dus of die hoër PLP konsentrasie teenwoordig in die eritrosiet, aanleiding gee tot 'n hoër proteïen AST poel.

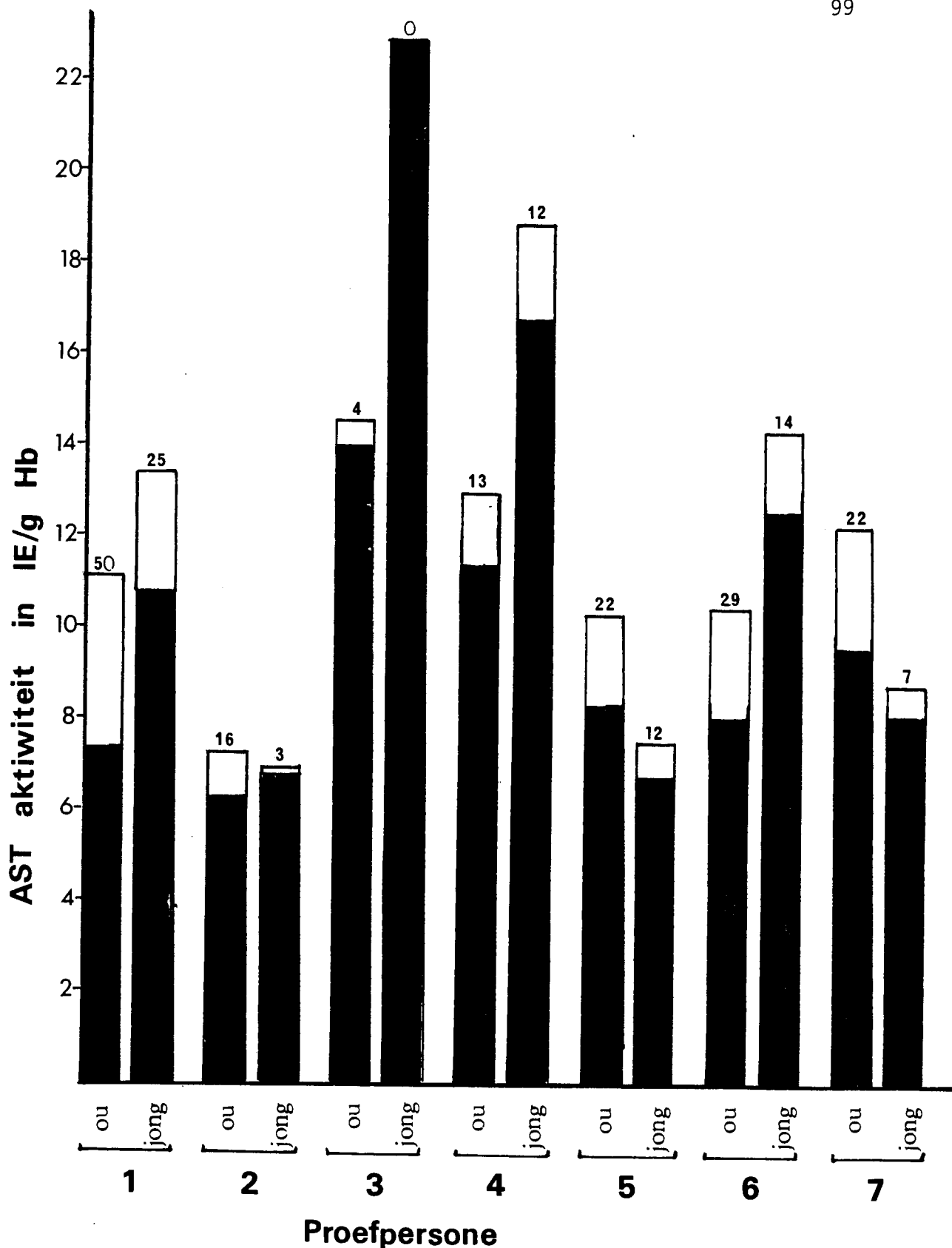


Fig 4.3 AST aktiwiteit in die hemolisate, berei uit ou en jong eritrosiet fraksies, van persone wat n hoë vitamien B₆ dieet gevolg het. Die donker deel van elke kolom weerspieël die basale, en die ligte deel, die totale AST aktiwiteit, na die in vitro byvoeging van PLP tydens die bepaling van AST aktiwiteit. Die persentasie aktivering van AST aktiwiteit na die in vitro PLP byvoeging, word bo-op elke kolom aangedui.

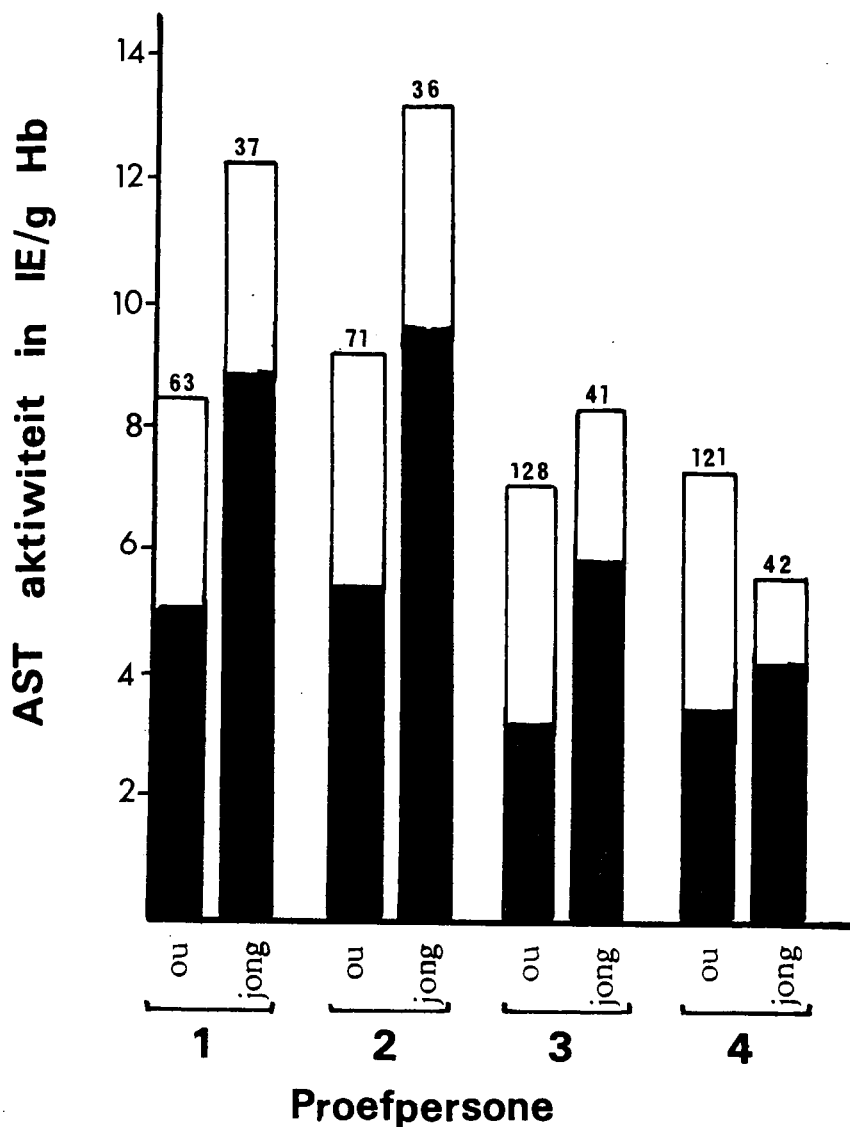


Fig 4.4 AST aktiwiteit in die hemolisate, berei uit ou en jong eritrosietfraksies, van persone wat 'n normale dieet gevolg het. Die donker deel van elke kolom weerspieël die basale, en die ligte deel, die totale AST aktiwiteit, na die in vitro byvoeging van PLP tydens die bepaling van AST aktiwiteit. Die persentasie aktivering van AST aktiwiteit na die in vitro PLP byvoeging, word bo-op elke kolom aangedui.

4.2.2 *Transketolase aktiwiteit*

Transketolase is 'n sitoplasmiese ensiem en is aktief in die pentosefosfaat pad. Dié ensiem benodig die koensiem, tiamienpirofosfaat (TPP) of vitamien B₂, vir katalitiese aktiwiteit.

Om vas te stel of die addisionele inname van vitamien B₆ ook die sintese van 'n ander vitamien afhanklike ensiem induseer, is transketolase aktiwiteit in heelbloedmonsters, volgens die metode beskryf in 4.1.2.3, bepaal.

Geen toename in totale transketolase aktiwiteit kon by 'n persoon op 'n hoë vitamien B₆ dieet, aangetoon word nie. Die gemiddelde totale transketolase aktiwiteit by die persoon op 'n hoë vitamien B₆ dieet was 10,60 IE/mmol Hb in vergelyking met 7,07 IE/mmol Hb by 'n persoon op 'n normale vitamien B₆ dieet. Beide hierdie waardes val binne die normale grense (5,5-12,1 IE/mmol Hb) verkry deur Van Zanten en medewerkers [121]. In beide gevalle het die ensiem, transketolase, na die in vitro byvoeging van sy koensiem, TPP, 'n persentasie toename van tussen 28-30 % getoon.

Die addisionele inname van vitamien B₆ het dus geen invloed op transketolase aktiwiteit gehad nie en geen induksie van proteïen transketolase sintese kon aangetoon word nie.

4.2.3 *Laktaatdehidrogenase aktiwiteit*

Laktaatdehidrogenase (LDH) benodig nie 'n vitamien as koensiem vir sy katalitiese aktiwiteit nie. Die effek van 'n hoë vitamien B₆ inname deur die dieet op LDH aktiwiteit is bepaal. Die LDH aktiwiteit in hemolisaat monsters, berei uit heelbloed wat versamel is van 'n persoon op 'n hoë vitamien B₆ dieet, is vergelyk met dié van 'n persoon op 'n normale daaglikse vitamien B₆ inname.

Die LDH aktiwiteit van twee persone op 'n hoë vitamien B₆ dieet (201 en 242 IE/g hemoglobien respektiewelik) het nie betekenisvol verskil van die persone met 'n normale vitamien B₆ dieet (226 en 245 IE/g hemoglobien respektiewelik) nie.

'n Hoë vitamien B₆ inname het dus geen effek op die de nova proteïen sintese van vitamien B₆ onafhanklike ensieme, soos LDH nie.

Samevattend

Na die addisionele inname van vitamien B₆ deur die dieet vir 'n periode van vier weke, het die basale sowel as totale AST aktiwiteit in die eritrosiete toegeneem. 'n Laer persentasie aktivering van AST aktiwiteit na die in vitro byvoeging van PLP is ook in die hemolisate aangetoon.

In die plasma was die ensiem tot 'n groter mate versadig met sy koensiem na die addisionele inname van vitamien B₆. Die totale AST aktiwiteit in die plasma het egter nie toegeneem nie.

Met die fraksionering van heelbloed in verskillende eritrosietfraksies, is gevind dat die AST in die jong selle tot 'n groter mate versadig is met PLP, as in die ou eritrosietfraksies. Persone op 'n hoë vitamien B₆ dieet het ook oor die algemeen 'n hoër AST aktiwiteit in beide die ou en jong eritrosietfraksies getoon in vergelyking met persone op 'n normale dieet.

Die addisionele inname van vitamien B₆ het geen invloed op die ensiemproteïensintese van transketolase, 'n vitamien B₁ afhanklike ensiem, of LDH, 'n nie-vitamien afhanklike ensiem, gehad nie.

HOOFSTUK 5

ALGEMENE BESPREKING

5.1	Metodiek	104
5.2	Die invloed van die in vitro vitamien B ₆ opname op die eritrosiet AST aktiwiteit	108
5.3	Die invloed van die in vivo vitamien B ₆ opname op die eritrosiet AST aktiwiteit	110

HOOFSTUK 5

ALGEMENE BESPREKING

5.1 Metodiek

Dit is alreeds sedert 1955 bekend dat die in vitro byvoeging van PLP tot die inkubasiemedium AST aktiwiteit in die plasma verhoog [55]. Daar is egter eers in 1977 deur die IFKC voorgestel dat PLP by die inkubasiemedium gevoeg moet word vir die akkurate bepaling van die AST aktiwiteit in die sera en plasma [8]. Vanweë verskeie praktiese probleme en die modernisering van apparaat, lewer die byvoeging van PLP vandag nog probleme en word AST aktiwiteit in die meeste laboratoria sonder die in vitro byvoeging van PLP bepaal. Ons het gepoog om 'n gestandaardiseerde metode op 'n outomatiese ensiemanaliseerder te ontwikkel wat algemeen in die kliniese laboratorium gebruik kan word. In hierdie doel is geslaag deur 'n metode met 'n variasiekoëffisiënt van 1.8 en 'n produktiwiteit van 15 bepalinge per uur te ontwikkel. Hierdie metode is ook geskik vir die bepaling van die AST aktiwiteit in die sera of plasma met behulp van die heel moderne ensiemanaliseerders, wat van 'n swaaiende rotor gebruik maak tydens die analises en produktiwiteit kan met hierdie apparate selfs nog verder verhoog word.

Tydens hierdie eksperimente om bostaande probleem op te los, het dit duidelik geword dat die plasma vir 'n tyd lank met PLP gepreïnkubeer moet word vir die bepaling van die totale AST aktiwiteit. Die IFKC het dan ook 'n preïnkubasietyd van 10 minute [8] voorgestel, terwyl Garber et al [118] 'n metode vir die SMAC technicon ontwikkel het wat om praktiese redes die monster net vir 4,5 minute met PLP gepreïnkubeer. Daar was ook nie duidelikheid in die literatuur oor die preïnkubasietyd wat nodig is om die hemolisaat AST aktiwiteit te bepaal nie en of die preïnkubasietyd met PLP nodig vir totale serum AST aktiwiteit in ernstige siek pasiënte verander nie. In hierdie studie is aangetoon dat die hemolisaat apoensiem reeds binne

2,5 minute volledig geaktiveer is in die teenwoordigheid van PLP, maar dat 'n preïnkubasietyd van minstens 10 tot 12 minute nodig is vir die aktivering van die plasma apoensiem. Hierdie feit moet in aanmerking geneem word in die ontwikkeling van enige moderne metode vir die bepaling van plasma AST aktiwiteit.

'n Aanvanklike inhibisie van die plasma AST aktiwiteit, wat eers na ongeveer vier minute opgehef is, is waargeneem. Dit beteken dat indien die preïnkubasietyd te kort is, vals negatiewe waardes verkry sal word, wat weer vals normale waardes tot gevolg sal hê. Die preïnkubasietyd nodig vir die aktivering van die plasma AST met PLP kon nie verkort word deur die verhoging van PLP konsentrasie of 'n verhoging in preïnkubasie temperatuur nie.

Burger en Potgieter [7] het aangetoon dat die AST in die lewer en hart versadig is met PLP. Dit beteken dat die ensiem in alle ander weefsel met uitsondering van die eritrosiete, in die aktiewe holovorm teenwoordig is. Die eritrosiet verskil van ander selle deurdat die meeste sel organelle soos die kern, mitochondria, lisosome, endoplasmiese retikulum ens. verlore gaan tydens die proses van eritropoïese. Die volwasse eritrosiet besit dus nie die vermoë om nuwe proteïene te sintetiseer nie. Die verlies van die lisosome veroorsaak ook dat die proteïene in die eritrosiet 'n langer leeftyd het as in die ander liggaamsselle. AST, wat 'n ensiemproteïen is, se funksie in die volwasse eritrosiet kan dus bevraagteken word, aangesien dit normaalweg betrokke is by aminosuurmetabolisme en dus by energiewerskaffing deur die mitochondria en ook indirek by proteïensintese. In die gekernde voorloperselle, tydens die ontwikkeling van die eritrosiet, vervul AST dan ook dieselfde funksie as in die ander liggaamsselle. AST word dus ook nie in die volwasse eritrosiet benodig nie, maar word ook nie vernietig nie en dit kan in die eritrosiet verouder. Tydens hierdie veroudering is konformasieveranderinge en kleiner chemiese

modifikasies moontlik, wat sal veroorsaak dat die ensiem se affiniteit vir sy koensiem afneem. Dit is bekend dat die AST isoensieme in die eritrosiet dieselfde is as die s.AST isoensiem van die lewer [42]. Hierdie isoensiem bestaan uit vyf subvorms met iso-elektrofokusering, waarvan die drie meer suurvorms, minder aktief is as die meer alkaliese subvorms. Verskeie redes word aangevoer vir die ontstaan van die subvorms en dit is verder moontlik dat die meer onaktiewe subvorms, PLP moeiliker bind. Dit sou beteken dat in 'n eritrosiet populasie wat uit ou en jong eritrosiete bestaan, 'n persentasie eritrosiete teenwoordig is, wat verouderde AST bevat wat gedeeltelik die vermoë verloor het om PLP te bind. PLP kan ook maklik deur middel van 'n Schiffs basis aan ander proteïne, soos byvoorbeeld hemoglobien, bind en dit mag selfs 'n groter affiniteit vir hemoglobien as vir AST hê. Dit sal beteken dat 'n deel van die AST in die eritrosiet populasie nie versadig is met PLP nie en verklaar waarom AST in die hemolisaat in teenstelling met ander weefsel, in die onversadigde apoensiemvorm voorkom.

Dit noop 'n mens om te spekuleer dat die AST apoensiem, teenwoordig in die plasma, hoofsaaklik afkomstig is vanaf die eritrosiete. Die toestande in die plasma, is egter baie minder gunstig vir die behoud van die AST ensiemproteïen as in die eritrosiet as gevolg van verskeie faktore. Die belangrikste hiervan is miskien die heterogene kataboliese ensieme, wat in klein konsentrasies in die plasma voorkom en wat die AST apoensiem blootstel aan 'n groter mate van inaktivering, sodat die ensiem in vitro moeiliker geaktiveer word deur die byvoeging van PLP. 'n Langer tydperk is dus nodig vir die vorming van die holoensiem. Dit verklaar dan ook die langer preïnkubasietyd van plasma AST teenoor die hemolisaat AST, wat nodig is, vir volle aktivering van die ensiem.

'n Verdere ondersoek na die vyf subvorms van s.AST, gevind deur van Reij [42] in die eritrosiet is nodig om meer lig op

hierdie bevindings te werp. In die eerste plek sal die kwantitatiewe verhouding van die subvorms in die ou en jong eritrosiete bestudeer moet word om die argument dat die veroudering van die eritrosiet aanleiding gee tot 'n meer onaktiewe AST, te probeer staaf. In die tweede plek sal die relatiewe aktiwiteit van die verskillende subvorms meer noukeuring nagegaan moet word om vas te stel of die K_m waardes van die verskillende vorme wel tot so 'n mate verskil dat dit die aanleidende oorsaak van die onaktiewe subvorms kan wees. 'n Ander moontlikheid is dat die onaktiewe subvorms die gevolg is van die ensiem se onvermoë om sy kofaktor te bind. In hierdie geval sal 'n studie van die dissosiasie-konstantes van die subvorms nodig wees.

Nadat meer inligting oor die subvorme van die AST ensiem en hul vermoë om aan PLP te bind verkry is, sal daar hopelik meer inligting beskikbaar wees om die kort aktiveringstyd van AST met PLP in die hemolisaat, teenoor die lang aktiveringstyd van AST met PLP in die plasma, te verklaar. Hierdie inligting sal hopelik ook die aanvanklike inhibisie van plasma AST aktiwiteit na die byvoeging van PLP kan verduidelik.

Die preïnkubasietyd nodig om die plasma AST aktiwiteit van pasiënte met hart- en lewersiektes te aktiveer, is soos in die geval van normale hemolisaatbereidings, ook net 2,5 minute. Die ensiem teenwoordig in die plasma tydens hierdie siektetoestande, is afkomstig van die patologiese weefsel en is gevolglik in die meer aktiveerbare vorme teenwoordig. 'n Verskil in die persentasie aktivering van die AST aktiwiteit, afkomstig van dieselfde tipe weefsel, afhangende van die patologiese letsel, is al aangetoon [71]. Die preïnkubasietyd met PLP nodig vir aktivering van die ensiem, onder verskillende patologiese toestande, is egter nog nie direk ondersoek nie. Dit lyk egter uit ons eksperimente of daar nie 'n verskil in die aktivering van ensiemaktiwiteit tussen hart- en lewerpasiënte is nie. Hierdie twee toestande het gewoonlik

nie dieselfde patologiese beeld nie. Die verskil in persentasie aktivering onder verskillende patologiese toestande moet dus eerder in die vernietiging van PLP, as in die inaktivering van AST self, gesoek word.

Dit is somtyds moeilik om bloedmonsters vinnig by die laboratorium te kry, veral waar die pasiënte nie in 'n kritiekesorg eenheid is nie en waar een laboratorium meer as een hospitaal moet bedien. Daarom is die AST aktiwiteit in gestoorde bloed, ook ondersoek. Daar is gevind dat die AST aktiwiteit in hemolisate, sowel as die persentasie aktivering van die ensiem in die teenwoordigheid van PLP, vir 27 uur onveranderd bly wanneer die hemolisate onmiddelik berei word. Geen ander voorsorgmaatreëls het bevredigende resultate gelewer nie. Daar word dus aanbeveel dat wanneer eritrosiete gebruik word vir die bepaling van vitamien B₆ status van die liggaam, die hemolisate dadelik berei moet word en dan vir 'n maksimum van 27 uur gestoor kan word.

5.2 Die invloed van die in vitro vitamien B₆ opname op die eritrosiet AST aktiwiteit.

Dit is bekend dat AST in alle weefsel in die liggaam met uitsondering van die eritrosiete, versadig is met PLP [7]. Anderson en medewerkers [9], het met behulp van radioaktief-gemerkte vitamien B₆ derivate en in vitro inkubasiestudies aangetoon dat PN, die vorm waardeur vitamien B₆ per mond ingeneem word, wel deur die eritrosiet opgeneem word en na die aktiewe vorm, PLP, omgeskakel word. Die vraag ontstaan nou of die normale gebalanseerde dieet onvoldoende vitamien B₆ bevat om die eritrosiet AST te versadig en of die PLP, wat deur die eritrosiet opgeneem word, om een of ander rede nie toeganklik is vir die eritrosiet AST nie.

In die eerste plek is Anderson et al [9] se in vitro inkubasiestudies herhaal, maar is van AST as merker gebruik gemaak. Geen aktivering van die eritrosiet AST apoensiem kon tydens hierdie eksperimente aangetoon word nie. Dit lyk dus of die PLP nie aan die intrasellulêre AST beskikbaar gestel word nie.

Daar is verskeie moontlike verklarings vir die gebrek aan aktivering van die eritrosiet AST aktiwiteit deur die PLP, wat intrasellulêr gesintetiseer word. Dit is bekend dat farmakologiese dosisse PLP nodig is vir maksimale aktivering van AST aktiwiteit in vitro [8]. Die intrasellulêre PLP konsentrasie as gevolg van die in vitro PN opname, mag te laag wees vir aktivering van die ensiem. Verder mag PLP 'n hoër affiniteit vir ander sellulêre proteïne hê. Verskeie navorsers [111-113] het aangetoon dat PLP wel aan hemoglobien bind. Anderson et al [9] het voorgestel dat PLP vinnig omgeskakel word na PL deur 'n alkaliese fosfatase en dat PL dan geleidelik in die plasma vrygestel word. Mehanso et al [110] het aangetoon dat beide PLP en PL waarskynlik op dieselfde bindingsloki aan hemoglobien bind. Deur hierdie meganisme kan die PL konsentrasie binne die eritrosiet tot vier keer hoër wees as in die plasma en mag dit as belangrike bron van sirkulerende PL dien.

'n Ander interessante waarneming wat tydens hierdie eksperimente na vore gekom het, is die beskermende effek wat PLP op die AST ensiem uitoefen. Tydens die inkubasie van heelbloed met PN en PLP was daar 'n kleiner verlies van AST uit die eritrosiet na die plasma as wat die geval met die inkubasie van heelbloed alleen was. Martinez-Carrion en Tiemeier [32] het getoon dat die AST molekule uit twee polipeptied-subeenhede bestaan. Elke subeenheid bind een molekule PLP met behulp van 'n Schiff's basis aan 'n lisiel residu. Schlegel [122] het gevind dat die binding van PLP aan AST, tot 'n konformasieverandering van die ensiem lei. Hierdie konformasieverandering mag daartoe lei dat die ensiem nie so maklik uit die selle sal lek, as wanneer PLP nie aan die ensiem gebind is nie. 'n Selektiewe verlies van die ensiem uit die eritrosiete is dan ook tydens inkubasies van heelbloed met PN en PLP verkry deurdat meer apoensiem as holoensiem uit die selle verloor is. Hoewel die PN gemetaboliseer na PLP in die eritrosiete, tydens die inkubasiestudies, nie die intrasellulêre AST kon aktiveer nie, kon hierdie hoër PLP

konsentrasie in die selle, daartoe lei dat die bestaande binding van PLP en AST en konformasie van die ensiem beskerm word, sodat 'n kleiner hoeveelheid ensiem uit die selle lek as wat die geval met die inkubasie van heelbloed alleen was.

Dit is bekend dat PLP die suurstofdissosiasiekurwe van hemoglobien kan beïnvloed [123] onder toestande waar hemoglobien as plaas vervanger vir die eritrosiet gebruik word, om die suurstofdravermoë van die bloed te verhoog. As sulks mag PLP ook 'n fisiologiese rol in die eritrosiet vervul en kan die teenwoordigheid van die aktiewe PLP afhanklike anaboliese ensieme in die eritrosiet so verklaar word. Dit sal dan te wagte wees dat PLP 'n groter affiniteit vir hemoglobien het en daarom eerder aan die hemoglobien sal bind, in plaas van die AST wat geen funksie in die volwasse eritrosiet vervul nie.

'n Metode vir die akkurate bepaling van die eritrosiet vitamien B₆ derivate en 'n herhaling van die eksperimente van Anderson et al [9] met radioaktiefgemarkte materiaal, met die uitsluitlike doel om die tydsafhanklike metabolisme van die vitamien B₆ derivate te volg, is dus nodig. Terselfdertyd kan die binding van PLP aan die intrasellulêre proteïne soos byvoorbeeld hemoglobien en AST ondersoek word, om vas te stel of van die radioaktiefgemarkte materiaal by voorkeur aan een van die proteïne bind. Die dissosiasiekonstante van die binding tussen PLP en die intrasellulêre proteïne moet ook bepaal word, om die proteïen met die hoogste spesifisiteit vir binding aan PLP vas te stel.

5.3 Die invloed van die in vivo vitamien B₆ opname op die eritrosiet AST aktiwiteit.

In die lig van die bespreking in 5.2, lyk dit dus of die PN, opgeneem en gemetaboliseer na PLP in die eritrosiet, in die in vitro situasie nie onmiddelik beskikbaar is vir die aktivering van AST nie. Krishnaswamy [10] het egter 'n verskil in AST vlakke by persone van verskillende sosio-ekonomiese

groepe gevind en aangetoon dat die AST aktiwiteit by die persone van die laer sosio-ekonomiese groep, toeneem na addisionele inname van vitamien B₆ deur die dieet. In ons laboratorium is dieselfde bevindings ook by normale gesonde mense aangetoon. Dit is in ooreenstemming met die resultate van ander navorsers [12], wat 'n toename in die AST aktiwiteit by normale kontrole persone gevind het. Die toename in die AST aktiwiteit na die addisionele inname van vitamien B₆, kan verkeerdelik vertolk word as 'n aanduiding van die B₆ status van die liggaam. Die onvermoë van die eksogene vitamien B₆ derivate om die eritrosiet AST te aktiveer, dui egter daarop dat hierdie situasie nie die ware vitamien B₆ konsentrasie in die eritrosiet weergee nie en dus nie gebruik kan word om die vitamien B₆ status van die liggaam te bepaal nie. In ons eksperimente het nie alleen die basale AST aktiwiteit toegeneem nie, maar 'n toename in totale AST aktiwiteit is ook aangetoon. 'n Volledige versadiging van die apoensiem kon egter nie verkry word nie.

Die toename in totale AST aktiwiteit is ook deur Folkers et al [12] waargeneem. Hulle het verder beweer dat 'n tydperk van 5 tot 11 weke nodig is vir bereiking van dié maksimum eritrosiet AST aktiwiteit, wanneer mense met 'n lae totale aktiwiteit en 'n sg. vitamien B₆ tekort, behandel word met PN.

Met die fraksionering van heelbloed in verskillende eritrosiet fraksies, is gevind dat die persentasie aktivering van die AST aktiwiteit in die jong eritrosietfraksie kleiner is as in die ou eritrosietfraksie en dit dui dus op 'n groter mate van versadiging by die jong selle as by die ou eritrosiete. Dit lyk ook asof die totale AST ensiem konsentrasie in die jong selle hoër is as in die ou selle.

By die persone op 'n hoë vitamien B₆ inname (groep 1) was die ensiem in die jong selfraksie ook tot 'n groter mate versadig met PLP in vergelyking met persone op 'n normale dieet (groep 2). Ook hier lyk dit of die ensiemkonsentrasie in beide die ou en jong selfraksie van groep 1 hoër is as dié van groep 2.

Na verlies van die selorganelle van die eritrosiete, word verdere proteïensintese in die eritrosiet gestaak. Die verhoging in AST aktiwiteit na gereelde vitamien B₆ inname, kan dus nie verklaar word as gevolg van die verhoogde PLP konsentrasie teenwoordig in die eritrosiet nie aangesien ons met behulp van die in vitro studies aangetoon het dat die AST nie geaktiveer word nie. Dit lyk dus of die hoër PLP konsentrasie teenwoordig gedurende die ontwikkeling van die eritrosiet, aanleiding gee tot 'n verhoogde produksie van die ensiem wat dan 'n hoër totale AST aktiwiteit in die volwasse eritrosiet tot gevolg het. Dit verklaar ook die lang tydperk (5-11 weke) van addisionele vitamien B₆ inname wat nodig is om die maksimum AST aktiwiteit wat in die eritrosiet bereik kan word, te verkry. Die eritrosiet het 'n leeftyd van 120 dae en by korter tydperke sal daar dus 'n gemengde eritrosiet populasie, van selle wat aan 'n hoër PLP konsentrasie blootgestel is en ander wat nie daaraan blootgestel is nie, wees. Eers as die hele eritrosiet populasie aan 'n hoër PLP konsentrasie blootgestel is, tydens die proses van eritropoïese, sal die maksimum AST aktiwiteit bereik word.

Die toename in die totale eritrosiet AST aktiwiteit gee dus oorsprong aan die idee dat 'n hoër vitamien B₆ konsentrasie, de nova proteïensintese tydens die ontwikkeling van die eritrosiet induseer. Studies met vitamien B₆ onafhanklike ensieme het getoon dat hierdie begrip nie van toepassing is op die algehele proteïensintese in die sel nie. Studies met 'n model waar versnelde eritropoïese voorkom en ook met dubbelgemerkte aminosure word in die vooruitsig gestel om:

- (i) die invloed van PLP op die de nova proteïensintese van vitamien B₆ afhanklike ensieme te bestudeer en
- (ii) die invloed van vitamien B₆ op die proteïenomset van PLP afhanklike proteïene te bestudeer.

Die hoër basale AST aktiwiteit en gevolglike groter versadiging met PLP, kan verder verklaar word deur die konstante hoër PLP konsentrasie teenwoordig in die eritrosiete, wat 'n

beskermdende effek op die holo-AST mag uitoefen sodat 'n kleiner fraksie van die ensiem geïnaktiveer word. Die hoër persentasie versadiging van die jong eritrosietfraksie in vergelyking met die ou eritrosietfraksie, kan voorkom deurdat die ensiem-koensiem kompleks in die jong selle, meer stabiel is.

In die plasma was die ensiem ook tot 'n groter mate versadig met sy koensiem na die addisionele inname van vitamien B₆. Aangesien hoër vitamien B₆ vlakke as sulks in die plasma eerder 'n aanduiding van onlangse dieët inname as liggaams-status van vitamien B₆ is, kan dit nie dien as aanduiding van 'n hoër vitamien B₆ status nie. Hoewel daar 'n hoër basale aktiwiteit in die plasma voorgekom het, het die totale aktiwiteit konstant gebly. Die hoër graad van versadiging van die plasma AST kan te wyte wees aan die hoër PLP konsentrasie teenwoordig in die bloed.

Samevattend

1. In 'n poging om 'n gestandaardiseerde metode vir die bepaling van AST op die outomatiese Gilford sisteem te ontwikkel, is gevind dat 'n preïnkubasietyd van PLP met AST van minstens 10 tot 12 minute nodig is vir volle aktivering van die ensiem. In die geval van hemolisate en by plasma, verkry van pasiënte met hart- en lewersiektes, is volle aktiwiteit reeds binne 2,5 minute bereik. 'n Aanvanklike inhibisie, waargeneem tydens aktivering van normale plasma AST aktiwiteit met PLP, vereis 'n verdere studie van die subvorms teenwoordig in die eritrosiet.
2. Tydens in vitro inkubasiestudies van vitamien B₆ derivate, is gevind dat die PN, opgeneem deur die eritrosiet en gemetaboliseer na PLP, soos beskryf deur Anderson et al [9], nie beskikbaar is vir die aktivering van die eritrosiet AST nie. Die vitamien B₆ derivate het wel die verlies van ensiem uit die eritrosiete tot 'n mate beperk. Hierdie bevinding moet verder ondersoek word.

3. Met behulp van vitamien B₆ voedingstudies is gevind dat die aktivering van AST aktiwiteit met PLP in die eritrosiet, nie die ware beeld van die vitamien B₆ status in die liggaam weergee nie. Met gereelde daaglikse inname van groot dosisse PN HCL is daar wel 'n toename in basale sowel as totale AST aktiwiteit. Die toename in totale AST aktiwiteit is waarskynlik die gevolg van die induksie van proteïensintese van die ensiemproteïen onder die invloed van 'n groter PLP poel tydens eritropoïese. Die toename in basale AST aktiwiteit is die gevolg van die moontlike beskermende effek van die hoër PLP konsentrasie in die eritrosiet op die ensiem-koensiem kompleks. Deur gebruik te maak van modelle waar proteïenomset in die eritrosiet bestudeer kan word, kan verdere lig op hierdie nuwe interessante waarneming, gewerp word.

VERWYSINGS

1. Thurnham, D.I. (1981) Proc Nutr Soc 40, pp 155-163.
2. Kishi, H., Kishi, T., Williams, R.H., Folkers, K. (1975) Res Commun Chem Pathol Pharmacol 12(3), pp 557-569.
3. Bayoumi, R.A., Rosalki, S.B. (1976) Clin Chem 22(3), pp 327-335.
4. Folkers, K. (1974) Cancer Chemother Rep, Part 2, 4, p 19.
5. Raica, N., Sauberlich, H.E. (1964) Am J Clin Nutr 15, p 67.
6. Sauberlich, H.E., Carham, J.E., Baker, E.M., Raica, N., Herman, Y.F. (1972) Am J Clin Nutr 25, p 629.
7. Burger, F.J., Potgieter, G.M. (1978) Clin Chem 24(5), p 841.
8. Provisional Recommendations: IFCC Method for Aspartate aminotransferase. (1977) Clin Chem 23(5), pp 893-898.
9. Anderson, B.B., Fulford-Jones, C.E., Child, J.A., Beard, M.E.J. Bateman, C.J.J. (1971) J Clin Invest 50, pp1901-1909.
10. Krishnaswamy, K. (1971) Int J Vitam Nutr Res 41, p 240.
11. Azuma, J., Kishi, T., Williams, R.H. Folkers, K. (1976) Res Commun Chem Pathol Pharmacol 14(2), pp 343-348.
12. Folkers, K., Watanabe, T., Ellis, J.M. (1977) Res Commun Chem Pathol Pharmacol 17(1), pp 187-189.
13. Tietz, N.W. (1976) in 'Fundamentals of Clinical Chemistry' pp 673-674. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
14. Braunstein, A.E., Kritzman, M.G. (1937) Enzymologia 2, p 129.

15. King, J. (1965) in 'Practical Clinical Enzymology' p 121.
D van Nostrand Company LTD, London.
16. Wilkinson J.H. (1976) in 'The Principals and Practice of Diagnostic Enzymology' p 87. Edward Arnold, London.
17. Rosa, P.J., Sadeli, R., Schapira, G. (1958) Soc Biol 152, pp 422-424.
18. Evangelopoulos, A.E., Sizer, I.W. (1965) J Biol Chem 240, pp 2983- 2993.
19. Furbish, F.S. Fonda, M.L., Metzler, D.E. (1969) Biochemistry 8, pp 5169- 5180.
20. Fonda, M.L. (1971) J Biol Chem 246, pp 2230-2240.
21. Fasella, P., Turano, C. (1970) Vitam Horm 28, pp 157-194.
22. Churchich, J.E. (1972) J Biol Chem 247, pp 6953-6959.
23. Snell, E.E., Fasella, P.M., Braunstein, A.E., Rossi-Fanelli, A. (1963) in 'Chemical and Biological Aspects of Piridoxal Catalysis', pp197-215. Pergamon Press, New York.
24. Arrio-Dupont, M. (1969) Biochem Biophys Res Commun 36, pp 306-311.
25. Fonda M.L., Auerbach, S.B. (1976) Biochim Biophys Acta 422, pp 38-47.
26. Jenkins, W.T., Yphantis, D.A., Sizer, I.W. (1959) J Biol Chem 234, pp 51-57.
27. Jungner, G. (1957) Scand J Clin Lab Invest 10 suppl 31, p 280.
28. Fleischer, G.A., Potter, C.S., Wakim, K.G. (1960) Proc Soc Exp Biol Med 103, pp 229-231.

29. Boyd, J.W. (1961) *Biochem J* 81, p 432.
30. Nisselbaum, J.S., Bodansky, O. (1964) *J Biol Chem* 239, p 4232.
31. Wada, H., Morino, Y. (1964) *Vitam Horm* 22, p 411.
32. Martinez-Carrion, M., Tiemeier, D. (1967) *Biochemistry* 6, p 1715.
33. Nisselbaum, J.S., Bodansky, O. (1966) *J Biol Chem* 241, p 2661.
34. Nisselbaum, J.S. (1968) *Anal Biochem* 23, p 173.
35. Wakim, K.G., Fleischer, G.A. (1963) *J Lab Clin Med* 61, p 86.
36. Fleischer, G.A., Wakim, K.G. (1963) *J Lab Clin Med* 61, p 98.
37. Boyde, T.R.C., Latner, A.L. (1962) *Biochem J* 82, p 61.
38. Block W.D., Carmichael, R., Jacson, C.E. (1964) *Proc Soc Exp Biol Med* 115, p 941.
39. Decker, L.E., Rau, E.M. (1963) *Proc Soc Exp Biol Med* 112, p 144.
40. John, R., Jones, R. (1974) *Biochem J* 141, pp 401-406.
41. Michuda, C.M., Martinez-Carrion, M. (1969) *Biochemistry* 8, p 1095.
42. Rej, R. (1981) *Clin Chim Acta* 112, pp 1-11.
43. Arrio-Dupont, M., Cournil, I., Dure, P. (1970) *FEBS Lett* 11, pp 144-146.
44. Glatthaar, B.E., Barbarash, G.R., Noyes, B.E., Banaszak, L.J., Bradshaw, R.A. (1974) *Anal Biochem* 57, pp 432-451.
45. Magee, S.C., Phillips, A.T. (1971) *Biochemistry* 10, pp 3397-3405.

46. Banks, B.E.C., Doonan, S., Lawrence, A.J., Vernon, C.A. (1968) *Eur J Biochem* 5, pp 528-539.
47. Martinez-Carrion, M., Junaro, C., Chiancone, E., Bossa, F., Giartosio, A., Riva, F., Fasella, P. (1967) *J Biol Chem* 242, pp 2397- 2409.
48. Denisova, G.F., Polyanovsky, O.L. (1973) *FEBS Lett* 35, pp 129-132.
49. Denisova, G.F., Polyanovsky, O.L. (1974) *Biokhimiia* 39, pp 401-408.
50. Bossa, F., John, R.A., Barra, D., Fasella, P. (1968) *FEBS Lett* 2, pp 115-117.
51. Al-Mudhaffar, S.A., Al-Salihi, F. (1980) *Ind J Biochem Biophys* 17, pp 127-129.
52. Siekert, R.E., Fleischer, G.A. (1956) *Proc Staff Meet Mayo Clin* 31, pp 459-464.
53. Wang, C.C., Appelhanz, I. (1956) *Clin Chem* 2, pp 249-250.
54. Antebi, R.M., King, J. (1958) *Lancet* i, p 1133.
55. Karmen, A., Wróblewski, F., LaDue, J.S. (1955) *J Clin Invest* 34, p 126.
56. Matsuda, I., Miyoshiro, S., Miike, T., Nagata, N., Tamari, H., Taniguchi, N., Ohno, H., Watanabe, H. (1978) *Clin Chim Acta* 83, pp 231-234.
57. Hamfelt, A. (1966) *J Clin Invest* 18 (suppl 99), p 181.
58. Goodhart, R.S., Shils, M.E. (1973) in 'Modern Nutrition in Health and Disease', vyfde uitgawe, pp 210-220. Lea and Febiger, Philadelphia.

59. Snell, E.E. (1945) J Biol Chem 157, p 491.
60. Thomas, M.D. (1982) in 'Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations', pp 1216-1218. John Wiley & Sons, New York.
61. Thomas, M.D. (1982) in 'Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations', p 545. John Wiley & Sons, New York.
62. Kornecki, E., Feinberg, H. (1980) Am J Physiol 238, pp H54-H60.
63. Lam, S.C.T., Harfenist, E.J., Packham, M.A., Mustard, J.F. (1980) Thromb Res 20, pp 633-645.
64. Mohun, A.F., Cook, I.V.Y. (1957) J Clin Pathol 10, p 394.
65. Sall, T., Richards, H.K., Harrison, E., Myerson, R. (1957) J Clin Med 50, p 297.
66. Snell E.E. (1963) in 'Clinical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis', pp 523-532. Macmillan Co, New York.
67. Rej, R. Fasce, C.F., Vanderlinde, R.E. (1973) Clin Chem 19, pp 92-98.
68. Rosalki, S.B., Bayoumi, R.A. (1975) Clin Chim Acta 59, pp 357- 360.
69. Moss, D.W. (1976) Clin Chim Acta 67, pp 169-174.
70. Ratnaik, S., Moss, D.W. (1977) Clin Chim Acta 74, pp 281- 288.
71. De Waal, A., Le Roux, S., Potgieter, G.M., Barnard, H.C., Schoombie, E.M.S.P. (1982) Clin Chim Acta 122, pp 395-401.
72. Cheung, T., Briggs, M.H. (1974) Clin Chim Acta 54, pp 127-129.

73. Welbourn, N., Melrose, D.G., Moss, D.W. (1966) *J Clin Pathol* 19, pp 220-232,
74. Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M. (1974) *Clin Chim Acta* 96, pp 97-105.
75. Wada, H., Morino, Y. (1964) *Vitam Horm* 22, pp 441-444.
76. Rej, R., Vanderlinde, R.E. (1975) *Clin Chem* 21, pp 1585-1591.
77. Horder, M., Bowers, Jr., G.N. (1977) *Clin Chem* 23(3), pp 551-554.
78. Bayoumi, R.A., Rosalki, S.B. (1976) *Clin Chem* 22(3), pp 327-335.
79. Hamfelt, A. (1967) *Clin Chim Acta* 16, p 19.
80. Nobbs, B.T. (1974) *Lancet* i, p 405.
81. Hoorn, R.K.J., Flikweert, J.P., Westerink, D. (1975) *Clin Chim Acta* 61, p 151.
82. Rose, D.P., Strong, R., Folkard, J., Adams, P. (1973) *Am J Clin Nutr* 26, p 48.
83. Adams, P.N., Wynn, N., Rose, D.P. (1973) *Lancet* i, p 897.
84. Reinken, L., Hohenauer, L., Ziegler, E.E. (1972) *Clin Chim Acta* 36, p 270.
85. Fischer, I., Watter, H. (1971) *J Lab Clin Med* 78(5), pp 736-745.
86. Johansson, S., Lindstedt, S., Tiselius, H.G. (1974) *J Biol Chem* 249(9), pp 6040-6046.
87. Florin, M., Stotz, E.E. (1971) in 'Comprehensive Biochemistry', pp 47-71. Elsevier Publishing Co, Amsterdam.

88. Snell, E.E. (1961) Proc 5th Congr Biochem Moscow 4, p 268.
(Pergamon Press, London.)
89. Contractor, S.F., Shane, B. (1970) Biochem Biophys Res Commun 39, pp 1175-1181.
90. Wei, K.T., Bell, R.R., Haskell, B.E. (1972) Biochem Biophys Res Commun 48, pp 1617-1674.
91. Stanulovič, M., Jeremič, N., Charkin, S. (1976) Enzyme 21, pp 357-369.
92. Tryfiates, G.P., Saus, F.L. (1976) Biochem Biophys Acta 451, pp 333-341.
93. Johansson, S., Lindstedt, S., Tiselius, H.G. (1968) Biochemistry 7, pp 2327-2332.
94. Colombini, C.E., McCoy, E.E. (1970) Biochemistry 9, pp 533-538.
95. Lumeng, L., Lui, A., Li, T.K. (1980) J Clin Invest 66, pp 688-695.
96. Lyon, J.B., Jr., Bain, J.A., Williams, H.L. (1962) J Biol Chem 237, pp 1989-1991.
97. Cohen, P.A. Scheidemann, K., Gingsberg-Fellner, F., Sturman, J.A., Knittle, J., Gaul, G.E. (1973) J Nutr 103, pp 143-151.
98. Thiele, N.F., Brin, M. (1968) J Nutr 94, pp 237-240.
99. Beaton, G.H., Cheney, M.C. (1965) J Nutr 87, pp 125-132.
100. Brown, G.M., Reynolds, J.J. (1963) Ann Rev Biochem 32, pp 419-462.

101. Turner, J.M. (1961) *Biochem J* 80, pp 663-668.
102. Li, T.K., Lumeng, L., Vietsch, R.L. (1974) *Biochem Biophys Res Commun* 61, pp 677-684.
103. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. (1972) Second revised edition, pp 80-81. National Academy of Science/National Research Council, Washington D.C.
104. McCormick, D.B., Gregory, M.E., Snell, E.E. (1961) *J Biol Chem* 236, pp 2076-2084.
105. Lumeng, L., Li, T.K. (1978) *Fed Proc* 37, p 1976.
106. Lui, A., Lumeng, L., Li, T.K. (1981) *J Biol Chem* 256(12), pp 6041-6046.
107. Hamfelt, A. (1967) *Clin Chim Acta* 16, p 7.
108. Yamada, K., Tsuji, M. (1968) *J Vitaminol* 14, p 282.
109. Anderson, B.B., Pearth, M.B., Fullford-Jones, C.E. (1970) *J Clin Pathol* 23, p 232.
110. Mehanso, H., Henderson, L-V.M. (1980) *J Biol Chem* 255(24), pp 11901-11907.
111. Benesch, R.E., Benesch, R., Renthal, R.D., Maeda, N. (1972) *Biochemistry* 11, pp 3576-3582.
112. Arnone, A. (1972) *Nature* 237, pp 146-149.
113. Benesch, R.E., Yung, S., Suzuki, T., Bauer, C., Benesch, R. (1973) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 70, pp 2595-2599.
114. Lumeng, L., Li, T.K. (1974) *J Clin Invest* 53, pp 639-704.
115. Yamada, K., Tsuji, M. (1970) *J Vitaminol (Kyoto)* 16, pp 237-242.

116. Henson, C.P., Cleland, W.W. (1964) *Biochemistry* 3, pp 338-345.
117. Velick, S.F., Vavia, J. (1962) *J Biol Chem* 237, pp 2109-2122.
118. Garber, C.C., Feldbruegge, D.H., Hoessel, M. (1981) *Clin Chem* 27(4), pp 614-619.
119. Hafkenscheid, J.C.M., Hectors, M.P.C. (1977) *Clin Chim Acta* 78, pp 23-27.
120. Dacie, J.V., Lewis, S.M. (1975) in 'Practical Haematology', Fifth edition, p 80. Churchill Livingstone, Edinburgh.
121. Van Zanten, A.P., Beijer, C., Mairuhu, W.M. (1980) *Clin Chim Acta* 105, pp 303-310.
122. Schlegel, H., Christen, P. (1978) *Biochim Biophys Acta* 532, pp 6-16.
123. Baldwin, J.E., Gill, B. (1982) *Med Lab Sc* 39, pp 45-51.

OPSOMMING

In hierdie studie is daarin geslaag om 'n gestandaardiseerde metode vir die bepaling van AST aktiwiteit op 'n outomatiese analiseerder (Gilford 3500 sisteem) te ontwikkel. 'n Preïnkubasietyd van minstens 10 minute is nodig om die totale AST aktiwiteit in normale plasma te bepaal. 'n Aanvanklike inhibisie van plasma AST aktiwiteit is waargeneem na die in vitro byvoeging van PLP. Hierdie inhibisie kon nie opgehef word deur die PLP konsentrasie of die preïnkubasietemperatuur te verhoog nie. In teenstelling met normale plasma is 'n preïnkubasietyd van net $2\frac{1}{2}$ minute nodig vir die volle aktivering van die eritrosiet AST aktiwiteit. Die totale aktivering van die AST apoensiem in die plasma van hart en lewerpatiënte vind, soos in die geval van eritrosiet AST, ook binne $2\frac{1}{2}$ minute plaas. Daar is dus 'n verskil in aktivering van die apoensiem in normale plasma en in die plasma van sekere siek persone.

Daar is aangetoon dat piridoksien, wat deur die volwasse eritrosiet opgeneem word en na die aktiewe derivaat, naamlik piridoksaalfosfaat, omgeskakel word, nie beskikbaar is vir die aktivering van die onaktiewe AST in die volwasse eritrosiet nie. Die spesifieke rede hiervoor is nog onbekend en word verder ondersoek. Verskeie Vitamien B₆ derivate het egter wel die verlies van ensiem uit die eritrosiete, tot 'n mate beperk.

'n Toename in beide basale sowel as totale AST aktiwiteit is in die eritrosiete na 'n addisionele daaglikse vitamien B₆ inname oor 'n tydperk van vier weke waargeneem. Die ensiem in die plasma sowel as in die hemolisaatbereidings was tot 'n groter mate versadig met PLP na die addisionele vitamien B₆ inname, hoewel die totale AST aktiwiteit in die plasma nie toegeneem het nie. Hieruit blyk dit dat die 'CAS' beginsel vir die bepaling van 'n vitamien status van die liggaam, nie suksesvol in die geval van vitamien B₆ toegepas kan word nie.