

the other channel, thereby creating a sample of motile spermatozoa which can be used. For the determination of the motility we use the same principle as mentioned before and we combine this with the electrical detection of spermatozoa at the two outlet channels (see figure 2). The detection of the spermatozoa in both outlet channels is done with the same configuration as used for determining the concentration on-chip. We propose a new model for the determination of the separation efficiency of motile spermatozoa from the semen sample (10) and compare these simulated results with experimental data, which show good agreement. In this way we were able to distinguish between samples with motile and immotile spermatozoa.

### Outlook

Parameters of the semen quality that are normally determined in the hospital laboratory can be measured with LOC devices in an objective way making point-of-care diagnostics possible. With LOC devices a shift toward at-home analysis can be made, thereby reducing the costs and making it more patient friendly. Additionally, several measurements can easily be performed such that a better statement of the semen quality is obtained. This information can lead to a better treatment decision of the gynaecologist, thereby improving the care of the couple who are childless by default. The detection of cells with electrical impedance measurements in a microfluidic chip is not only restricted to spermatozoa in semen, but also other cells suspended in a fluid can be counted. The only condition is that the dielectric properties of the cell are different than those of the medium. Therefore microfluidic impedance cytometry can also be used for other medical diagnostic tests, like for instance a 3-part differential count of the leukocyte population (11, 12) and the detection of infected cells (13).

### References

1. Manz A, Graber N, Widmer HM. Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors Actuators B: Chem.* 1990; 1(1-6): 244-248.
2. Vrouwe EX, Luttge R, Vermes I, van den Berg A. Microchip capillary electrophoresis for point-of-care analysis of lithium. *Clin Chem.* 2007; 53(1): 117-123.
3. NVOG. Landelijke netwerkrichtlijn Subfertiliteit. 2010; Available from: <http://www.nvog.nl/>.
4. Keel BA, Quinn P, Schmidt CF Jr, Serafy NT Jr, Serafy NT Sr, Schalue TK. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Human Reprod.* 2000; 15(3): 680-686.
5. Keel BA. Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertil Steril.* 2006; 85(1): 128-134.
6. Brezina PR, Haberl E, Wallach E. At home testing: optimizing management for the infertility physician. *Fertil Steril.* 2011; 95(6): 1867-1878.
7. Segerink LI, Sprengels AJ, ter Braak PM, Vermes I, van den Berg A. On-chip determination of spermatozoa concentration using electrical impedance measurements. *Lab Chip.* 2010; 10: 1018-1024.
8. Cho BS, Schuster TG, Zhu X, Chang D, Smith GD, Takayama S. Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Anal Chem.* 2003; 75: 1671-1675.
9. Schuster TG, Cho B, Keller LM, Takayama S, Smith GD. Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. *Reprod BioMed Online.* 2003; 7(1): 75-81.
10. Segerink LI. Fertility chip, a point-of-care semen analyser. PhD thesis, 2011, University of Twente.
11. Holmes D, Pettigrew D, Reccius CH, et al., Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry. *Lab Chip.* 2009; 9: 2881-2889.
12. van Berkel C, Gwyer JD, Deane S, Green N, Holloway J, Hollis V, Morgan H. Integrated systems for rapid point of care (PoC) blood cell analysis. *Lab Chip.* 2011; 11 (7): 1249-1255.
13. Küttel C, Nascimento E, Demierre N, Silva T, Braschler T, Renaud P, Oliva AG. Label-free detection of *Babesia bovis* infected red blood cells using impedance spectroscopy on a microfabricated flow cytometer. *Acta Tropica.* 2007; 102 (1): 63-68.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2012; 37: 63-64



## Pyridoxine afhankelijke epilepsie

E.A. STRUYS, G. S. SALOMONS en C. JAKOBS

Andrew Hunt *et al* rapporteerden in 1954 over een jongetje die kort na zijn geboorte sterke convulsieve aanvallen kreeg (1). Deze aanvallen reageerden niet op gebruikelijke anti epileptica, maar wel op de intra musculaire toediening van pyridoxine (vitamine B6). Het kind bleef vrij van aanvallen door dagelijkse

orale inname van pyridoxine, en deze klinische entiteit werd pyridoxine afhankelijke epilepsie (PDE) genoemd. Lange tijd is PDE een puur klinische diagnose gebleven, waarbij het heroptreden van aanvallen na het stoppen van de pyridoxine suppletie, een van de diagnostische criteria was. In 2005 is ontdekt, in onderzoek waarin onze groep een belangrijke rol speelde, dat voor de overgrote meerderheid van patiënten, hun PDE werd veroorzaakt door een defect in de lysine afbraak met een autosomaal recessief overervingspatroon (2).

*Department of Clinical Chemistry, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands*

E-mail: [e.struys@vumc.nl](mailto:e.struys@vumc.nl)

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2012, vol. 37, no. 1*

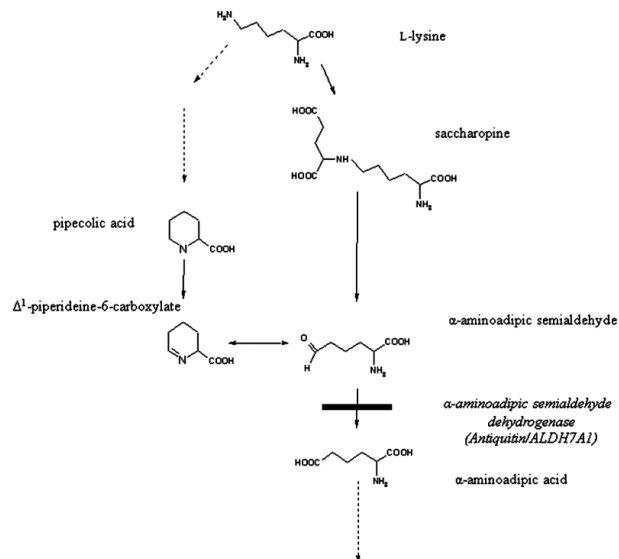
Mutaties in het *ALDH7A1* gen, coderend voor het enzym  $\alpha$ -aminoadipine semialdehyde ( $\alpha$ -AASA) dehydrogenase, leiden tot een defecte omzetting van  $\alpha$ -AASA naar  $\alpha$ -aminoadipine zuur, waardoor  $\alpha$ -AASA stapelt in het lichaam.  $\alpha$ -AASA is in spontaan evenwicht met zijn cyclische vorm piperideine-6-carbonzuur (P6C) en het is deze verbinding die ervoor zorgt dat de actieve vorm van B6 wordt weggevangen, waardoor hieraan een tekort ontstaat. Toediening van pyridoxine herstelt dit tekort en resulteert in het stoppen van de aanvallen.

Voortvloeiend uit bovenstaand onderzoek hebben wij een diagnostische test ontwikkeld om de biochemische diagnose van PDE te kunnen stellen: in urine van patiënten wordt met behulp van vloeistof chromatografie-tandem massaspectrometrie de niveaus van  $\alpha$ -AASA bepaald. Het is duidelijk geworden dat  $\alpha$ -AASA de biomarker is van PDE, ongeacht of de patiënten wel of niet met pyridoxine worden behandeld (3). In de afgelopen jaren hebben wij in meer dan 100 kinderen de biochemische diagnose van PDE gesteld. Moleculair onderzoek naar het *ALDH7A1* gen vindt tevens plaats op ons laboratorium.

### Vervolg

Nu we weten dat PDE het gevolg is van een defect in de afbraak van lysine, is het mogelijk om de afbraak van lysine beter te bestuderen. Huidige inzichten over de complexe afbraak van lysine, die via twee takken kan verlopen, berusten op inzichten verkregen in de jaren 70 van de vorige eeuw. Moderne technieken en beschikbaar gekomen stabiel-gelabelde substraten geven nieuwe handvaten om verder onderzoek te doen. We hebben fibroblasten (huidcellen) van bewezen PDE patiënten gekweekt in de aanwezigheid van twee vormen van [<sup>15</sup>N]-lysine:  $\alpha$ -[<sup>15</sup>N]-lysine en  $\epsilon$ -[<sup>15</sup>N]-lysine (4). Vervolgens werd de <sup>15</sup>N labeling gevolgd door het meten van verschillende intermediairen van de lysine afbraak. Hieruit werd duidelijk hoe lysine door fibroblasten wordt gemetaboliseerd, en dat pipercoline zuur door een tot-dan-toe onbekende omzetting gevormd wordt.

Zeër recent is door ons gevonden dat  $\alpha$ -AASA in verhoogde concentraties aanwezig is in de urines van patiënten met molybdenum cofactor deficiëntie en patiënten met sulfiet oxidase deficiëntie. Deze twee metabole aandoeningen presenteren zich klinisch door moeilijk te behandelen epilepsie en kinderen overlijden vaak op jonge leeftijd. *In-vitro* onderzoek door onze groep heeft uitgewezen dat anorganisch sulfiet, wat stapelt in deze defecten, het enzym  $\alpha$ -AASA dehydrogenase remt. Deze recente bevindingen maken het zeer aannemelijk dat pyridoxine toediening aan patiënten met molybdenum cofactor deficiëntie en patiënten met sulfiet oxidase deficiëntie, een gunstig effect zal hebben.



**Figuur 1.** Humaan lysine catabolisme.

### Toekomst

Momenteel zijn studies gaande om het lysine metabolisme in muizen te doorgronden. Dit onderzoek vloeit voort uit het eerder genoemde fibroblasten onderzoek en ook nu spelen de substraten  $\alpha$ -[<sup>15</sup>N]-lysine en  $\epsilon$ -[<sup>15</sup>N]-lysine een belangrijke rol.

Ondanks dat de epilepsie goed te behandelen is met pyridoxine, is de lange termijn uitkomst voor veel patiënten niet gunstig. Velen hebben een mentale achterstand. Verder onderzoek zal zich richten op het verfijnen van het huidige behandelingsprotocol. Wij zijn nauw betrokken bij studies waar de patiënten naast pyridoxine therapie, ook worden behandeld met een lysine beperkt dieet.

Daarnaast willen we verder gaan met de ontwikkeling van (dier) modellen om de gevolgen van disfunctioneel  $\alpha$ -AASA dehydrogenase in diverse organen inclusief de hersenen te onderzoeken.

### Referenties

1. Hunt AD, Stokes J, McCrory WM., Stroud HH. Pyridoxine dependency: report of a case of intractable convulsions in an infant controlled by pyridoxine. *Pediatrics*. 1954; 13(2): 140-145.
2. Mills PB, Struys E, Jakobs C, Plecko B, Baxter P, Baumgartner M, Willemsen MA, Omran H, Tacke U, Uhlenberg B, Weschke B, Clayton PT. Mutations in antiquitin in individuals with pyridoxine-dependent seizures. *Nat Med*. 2006; 12(3): 307-309.
3. Struys EA, Jakobs C. Alpha-aminoadipic semialdehyde is the biomarker for pyridoxine dependent epilepsy caused by alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2007; 91(4): 405.
4. Struys EA, Jakobs C. Metabolism of lysine in alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase-deficient fibroblasts: evidence for an alternative pathway of pipercolic acid formation. *FEBS Lett*. 2010; 584(1): 181-186.