

**KAEDAH DIMETILMETILENA BIRU (DMB) DAN ELEKTROFORESIS
RESOLUSI TINGGI (ERT) DALAM PENDIAGNOSAAN
MUKOPOLISAKARIDOSIS (MPS)**

SARUDDIN BIN ABBAS

**TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI SEBAHAGIAN
DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH SARJANA SAINS
KESIHATAN (SAINS BIOPERUBATAN)**

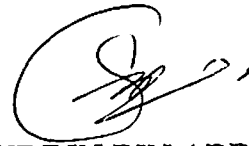
**FAKULTI SAINS KESIHATAN BERSEKUTU
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA
KUALA LUMPUR**

2008

PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

30 hb. Mei 2008



SARUDDIN BIN ABBAS
P 33946

PENGHARGAAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pemurah Lagi Maha Penyayang. Alhamdulillah. Syukur ke hadrat Allah s.w.t. kerana dengan rahmat dan izinNya, maka dapatlah saya menyempurnakan tesis ini. Semoga ilmu yang diperolehi akan diberkati.

Pertama sekali jutaan terima kasih saya ucapkan kepada penyelia utama saya, Prof. Dr. Jamaludin Mohamed dari Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu, UKM dan penyelia bersama Dr. Julia Omar dari Pusat Pengajian Sains Perubatan, USM diatas segala tunjuk ajar, bimbingan serta nasihat dalam menjayakan penyelidikan seterusnya penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih juga saya tujukan kepada Dr. Mohd Adi Firdaus Tan dan Dr. Rowani Mohd Rawi dari Pusat Pengajian Sains Perubatan, USM atas perkongsian maklumat dan pengetahuan serta peminjaman jurnal dan makalah yang berkaitan. Juga kepada Prof. Dr. Baharudin Omar dari Fakulti Sains Kesihatan Bersekutu, UKM; Prof. Madya Dr. Rusli Abdullah dan Dr. Kamarul Imran dari Pusat Pengajian Sains Perubatan, USM diatas tunjuk ajar dan bimbingan dalam penggunaan statistik.

Seterusnya penghargaan ini saya tujukan kepada staf Unit Metabolik, Jabatan Patologi Kimia, Pusat Pengajian Sains Perubatan, USM; Puan Hajjah Azizah Hj. Shaari dan Cik Norizam Mohd Yusof atas segala bantuan dalam pengutipan sampel kawalan dan pembelian bahan kimia. Tidak dilupakan penghargaan ini juga ditujukan kepada Pusat Pengajian Sains Perubatan, USM kerana telah membiayai penyelidikan ini dibawah Geran Penyelidikan Jangka pendek 304/PPSP/3151612 dengan Dr. Julia Omar sebagai penyelidik utama.

Akhir sekali, ingin saya merakamkan penghargaan yang tidak terhingga kepada isteri tersayang, Puan NorAtifah Mohd Adam dalam membantu menaip tesis ini dan diatas pengorbanan, doa, kesabaran dan galakkan yang telah diberikan sepanjang pengajian ini.

Semoga kalian semua akan mendapat keberkatan dan keredhaan dariNya.

Saruddin Bin Abbas

2008

ABSTRAK

Ketiadaan pusat rujukan penyakit mukopolisakaridosis (MPS) di Malaysia telah menjadi masalah bagi pendiagnosaan penyakit keturunan ini. Atas dasar tersebut, pembangunan dan pemantapan dua kaedah pendiagnosaan MPS telah dilakukan. Kaedah penaksiran kuantitatif glikoaminoglikan (GAG) jumlah iaitu kaedah dimetilmetilina biru (DMB) dan kaedah pengasingan GAG iaitu kaedah elektroforesis resolusi tinggi (ERT) telah dipilih dan digunakan dalam kajian ini. Kaedah DMB dan ERT dipilih berdasarkan laporan tentang kelebihan masing-masing berbanding dengan kaedah-kaedah yang lain, yang diperolehi melalui kajian kepustakaan. Kedua-dua kaedah ini telah digunakan sebagai ujian penyaringan bagi mendapatkan peratus prevalen MPS, kesesuaian setiap kaedah dan persetujuan antara kaedah. Sejumlah 79 sampel urin rawak yang dikutip dari tahun 1998 hingga tahun 2006 daripada kanak-kanak yang disyaki MPS berdasarkan gambaran klinikal di Hospital Universiti Sains Malaysia (HUSM) telah digunakan dalam kajian ini. Sampel yang disimpan pada suhu (-70°C) ini, telah dianalisa bersama-sama 28 sampel urin rawak kanak-kanak normal. Kaedah DMB memberikan keputusan tidak normal kepada 70% sampel pesakit, bagaimanapun keputusan ini diragui kerana kaedah ini telah memberikan keputusan positif palsu kepada 57% sampel kanak-kanak normal. Kesesuaian kaedah ERT sebagai kaedah penyaringan MPS didapati lebih meyakinkan dimana 4 % daripada sampel pesakit didapati tidak normal dan tiada keputusan positif palsu diberikan oleh kaedah ini. Peratus prevalen yang diperolehi dalam kajian ini ialah 70% melalui kaedah DMB dan 4% melalui kaedah ERT. Walaubagaimanapun berdasarkan kespesifikan 100% kaedah ERT, dapat disimpulkan bahawa peratus prevalen kes MPS di HUSM adalah 4%. Kajian juga mendapati persetujuan antara kaedah DMB dan kaedah ERT adalah sangat lemah dengan nilai pekali Kappa k adalah 0.034. Bagaimanapun kombinasi kaedah DMB dan kaedah ERT didapati mampu menghindarkan keputusan positif yang palsu.

DIMETHYLMETHYLENE BLUE (DMB) AND HIGH RESOLUTION ELECTROPHORESIS (HRE) METHODS IN THE DIAGNOSIS OF MUCOPOLYSACCHARIDOSIS (MPS)

ABSTRACT

The absent of a referral centre for mucopolysaccharidosis (MPS) in Malaysia is a major problem in detecting cases of these genetic disorders. As a move towards the betterment in health care system, development and optimization of the two proposed methods in this study were done for the diagnosis of MPS. One of the two methods was measuring the amount of total glycoaminoglycans (GAG) excreted by dimethylmethylen blue (DMB) method and the other was characterization of the total GAG by high resolution electrophoresis (HRE). Both methods were chosen based on literature reviews and reports of their superiority compared to the other available methods. By using these two methods the prevalence percentage of MPS and the agreement between both methods were obtained. 79 randomized urine samples from the year 1998 to 2006 were obtained from children suspected of MPS based on their clinical presentations from Universiti Sains Malaysia Hospital (HUSM), were used in this study. These samples which were kept at (-70°C) during the years were analyzed together with 28 randomized urine samples from normal children. Results based on the DMB method revealed abnormal findings of 70% in the samples analyzed. This method cast doubts in giving falsely positive results as the analysis on the normal urine samples also exhibit 57% abnormality (falsely high). However the HRE method gave a much more convincing result as only 4% of the samples analyzed showed abnormal bands and no false positive result was given by this method. The prevalence percentage obtained in this study based on DMB method was 70 % and the HRE method was 4%. However based on 100% specificity given by ERT, we concluded that the prevalence percentage of MPS cases in HUSM was 4 %. Method agreement between both was poor based on Kappa coefficient, k was only 0.034. Combination of both methods in this study however was found to have potential in eliminating false positive results.

KANDUNGAN

	Halaman
PENGAKUAN	ii
PENGHARGAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KANDUNGAN	vi
SENARAI JADUAL	x
SENARAI RAJAH	xi
SENARAI GAMBARFOTO	xii
SENARAI SIMBOL/SINGKATAN/TATANAMA/ISTILAH	xiii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Pengenalan	1
1.2 Kepentingan Kajian	3
1.3 Objektif Umum	5
1.4 Objektif Khusus	5
1.5 Hipotesis Kajian	5
BAB II KAJIAN KEPUSTAKAAN	
2.1 Glikoaminoglikan (GAG)	6
2.1.1 Proteoglikan: gabungan GAG dan protein	7
2.1.2 Jenis GAG	8
a. Chondroitin sulfat (CS)	9
b. Dermatan sulfat (DS)	11
c. Keratan sulfat (KS)	11
d. Heparan sulfat (HS)	12
e. Hyaluronan	13
2.1.3 Proses sintesis GAG	14
2.1.4 Proses degradasi GAG	14

2.2	Mukopolisakaridosis (MPS)	16
2.2.1	Kegagalan degradasi DS	17
2.2.2	Kegagalan degradasi HS	17
2.2.3	Kegagalan degradasi KS	17
2.2.4	Pengkelasan MPS	21
	a. MPS I	24
	i. MPS IH (Sindrom Hurler)	24
	ii. MPS IS (Sindrom Scheie)	25
	iii. MPS IH/S (Sindrom Hurler/Scheie)	25
	b. MPS II (Sindrom Hunter)	26
	i. MPS IIA (Sindrom Hunter A)	26
	ii. MPS IIB (Sindrom Hunter B)	27
	c. MPS III (Sindrom Sanfilippo)	27
	d. MPS IV (Sindrom Morquio)	28
	i. MPS IVA (Sindrom Morquio klasik)	28
	ii. MPS IVB (Sindrom menyerupai Morquio)	29
	e. MPS VI (Sindrom Maroteaux-Lamy)	29
	f. MPS VII (Sindrom Sly)	29
	g. MPS IX (Sindrom Natowicz)	30
2.3	Pengesanan MPS	30
2.3.1	Penyiasatan biokimia	31
	a. Kaedah penaksiran GAG jumlah secara kualitatif	31
	b. Kaedah penaksiran GAG jumlah secara kuantitatif	33
	c. Kaedah pengasingan GAG	36
BAB III	BAHAN DAN KAEDAH	
3.1	Bahan Kimia	38
3.2	Peralatan	38
3.3	Jenis Kajian	39
3.4	Persampelan	39
3.5	Kaedah	39
3.5.1	Reagen	39
	a. Larutan penimbal natrium format 0.2 M pH 3.5	39
	b. Larutan stok pewarna DMB	39
	c. Larutan kerja pewarna DMB	40
	d. Larutan stok piawai GAG 1 mg/ml	40
	e. Larutan kerja piawai GAG 100 ug/ml	40
	f. Larutan asid sitrik 1.43 M	40
	g. Larutan penimbal sitrat 0.054 M pH 4.8	40

h. Larutan setilpiridinium klorida (SPK)-sitrat	41
i. Larutan litium klorida 2 M	41
j. Larutan akuas barium asetat 1 M pH 5.0	41
k. Larutan akuas barium asetat 0.1 M pH 5.0	41
l. Larutan barium asetat 0.1 M pH 5.0 dalam larutan etanol 15%	41
m. Larutan barium asetat 0.1 M pH 5.0 dalam larutan etanol 50%	41
n. Larutan pewarna alsian biru 0.25% (b/i)	42
o. Larutan fenol merah	42
p. Larutan asid asetik 1% (b/i)	42
3.5.2 Kaedah kajian	42
3.5.3 Penaksiran paras kreatinina dalam urin dengan kaedah Jaffe (Bonsnes & Taussky 1945)	44
3.5.4 Penaksiran kuantitatif paras GAG jumlah dalam urin dengan kaedah DMB (Whitley et al. 1989)	46
3.5.5 Pengasingan GAG dalam urin dengan kaedah ERT (Hopwood & Harisson 1982)	46
a. Presipitasi GAG daripada urin	46
b. Pengasingan GAG dengan kaedah ERT	49
3.5.6 Analisis data	55
BAB IV	KEPUTUSAN
4.1	Sampel Pesakit 56
4.2	Penaksiran Paras GAG Jumlah Dengan Kaedah DMB 57
4.2.1	Kadar peningkatan paras GAG jumlah 57
4.3	Hasil Pengasingan GAG Dengan Kaedah ERT 57
4.3.1	Pengasingan GAG bagi sampel pesakit 62
4.3.2	Pengasingan GAG bagi sampel kawalan negatif 62
4.4	Peratus Prevalen MPS 62
a.	Peratus prevalen MPS melalui kaedah DMB 62
b.	Peratus prevalen MPS melalui kaedah ERT 62
4.5	Persetujuan Antara Kaedah DMB Dan Kaedah ERT 63
BAB V	PERBINCANGAN 64
BAB VI	RUMUSAN
6.1	Rumusan dan Penemuan Kajian 76
6.2	Cadangan Kajian Lanjutan 76

RUJUKAN	77
----------------	-----------

LAMPIRAN

A	Gambarfoto Keadaan Fizikal Pesakit MPS	93
B	Keputusan Penaksiran Paras GAG Jumlah Bagi Sampel Pesakit	95
C	Keputusan Penaksiran Paras GAG Jumlah Bagi Sampel Kawalan Negatif	98
D	Keputusan Penaksiran Paras GAG Jumlah Bagi Sampel Kawalan Positif	100
E	Keputusan Pengasingan GAG Bagi Sampel Pesakit	101
F	Keputusan Pengasingan GAG Bagi Sampel Kawalan Negatif	104
G	Hasil Pengiraan SPSS: Persetujuan Antara Kaedah DMB dan Kaedah ERT Menggunakan Kaedah Statistik Kappa	105

SENARAI JADUAL

No. Jadual		Halaman
1.1	Negara kes MPS pernah direkodkan	3
2.1	Jenis dan ciri GAG	10
2.2	Kelas-kelas MPS dan ciri-cirinya	21
3.1	Julat rujukan GAG jumlah dalam urin berdasarkan julat umur	43
3.2	Peringkat ERT, kepekatan etanol dan jenis GAG terlibat	49
3.3	Kaitan pekali statistik Kappa, k dengan darjah persetujuan	55

SENARAI RAJAH

No. Rajah		Halaman
2.1	Contoh struktur proteoglikan pada tulang rawan	8
2.2	Struktur asas chondroitin 4-sulfat	9
2.3	Struktur asas chondroitin 6-sulfat	9
2.4	Struktur asas dermatan sulfat	11
2.5	Struktur asas keratan sulfat	12
2.6	Struktur asas heparan sulfat	12
2.7	Struktur asas hyaluronan	13
2.8	Tapak jalan proses degradasi DS. Gangguan enzim dan kelas MPS: 1- MPS II, 2 - MPS I, 3 - MPS IV, 4 - Penyakit Sandhoff, 5 - MPS VII	18
2.9	Tapak jalan proses degradasi HS. Gangguan enzim dan kelas MPS: 1- MPS II, 2 - MPS I, 3- MPS IIIA, 4 - MPS IIIC, 5 - MPS IIIB, 6 - Belum diketahui, 7 - MPS VII, 8 - MPS IIID	19
2.10	Tapak jalan proses degradasi KS. Gangguan enzim dan kelas MPS: 1- MPS IVA, 2 - MPS IVB, 3- MPS IIID	20
3.1	Ringkasan kaedah kajian	45
3.2	Carta alir proses presipitasi GAG	48
3.3	Kedudukan plat selulos aetat dan wik dalam sistem ERT	51
3.4	Kedudukan sampel dan wik diatas plat selulos aetat	52
3.5	Carta alir proses ERT	53
4.1	Peratus pecahan pesakit mengikut julat umur	56
4.2	Taburan kadar peningkatan paras GAG jumlah	58

SENARAI GAMBARFOTO

No. Gambarfoto	Halaman
4.1 Hasil pengasingan GAG oleh kaedah ERT di atas plat selulos asetat 1	59
4.2 Hasil pengasingan GAG oleh kaedah ERT di atas plat selulos asetat 2	60
4.3 Hasil pengasingan GAG oleh kaedah ERT di atas plat selulos asetat 3	61

SENARAI SIMBOL/SINGKATAN/TATANAMA/ISTILAH

%	peratus
°C	darjah celsius
b/i	berat per isipadu
BM	berat molekul
C/N	'catalog number'
C-2	karbon 2
C-4	karbon 4
C-6	karbon 6
CS	chondroitin sulfat
CS-4	subjenis chondrotin 4-sulfat
CS-6	subjenis chondrotin 6-sulfat
DMB	dimetilmetilina biru
DS	dermatan sulfat
DS1	subjenis dermatan sulfat yang bergerak perlahan
DS2	subjenis dermatan sulfat yang bergerak cepat
ERT 1	proses ERT peringkat pertama
ERT 2	proses ERT peringkat kedua
ERT 3	proses ERT peringkat ketiga
ERT	elektroforesis resolusi tinggi
g	gram
GAG	glikoaminoglikan
Gal	galaktosa
GalNAc	N-asetilgalaktosamina
GlcNAc	N-asetilglukosamina
GlcUA	asid glukuronik
HS	heparan sulfat
HUSM	Hospital Universiti Sains Malaysia
i/i	isipadu per isipadu
IdUA	asid iduronik
kDa	kilo Dalton
KS	keratan sulfat
M	molar
mg	miligram
mg/L	miligram per liter
mg/ml	miligram per mililiter
ml	mililiter
mm	milimeter
mmol/L	milimol per liter
MPS	mukopolisakaridosis
nm	nanometer
pH	ukuran keasidan atau kealkalian sesuatu larutan
PPSP	Pusat Pengajian Sains Perubatan
Pra ERT	proses untuk mengkondisikan wik
RMS	ralat metabolik semulajadi
rpm	'revolution per minute'

SPK	setilperidinium klorida
SPSS	'Statistical Product and Service Solution'
STAB	setiltrimetilamonibromida
UDP	uridina difosfat
UKM	Universiti Kebangsaan Malaysia
USM	Universiti Sains Malaysia
V	volt
$\mu\text{g/ml}$	mikrogram per mililiter
μl	mikroliter
μmol	mikromol

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Sekumpulan penyakit yang dipanggil ralat metabolik semulajadi (RMS) mula didedahkan oleh Garrod pada tahun 1908. Kumpulan penyakit RMS ini adalah berkaitan dengan halangan atau gangguan dalam tapak jalan metabolik yang disebabkan oleh kekurangan enzim yang secara langsung merencat tapak jalan tersebut di peringkat sel (Garrod 1909).

RMS dikategorikan sebagai penyakit yang jarang terjadi. Secara individu RMS jarang ditemui tetapi jika diteliti secara kolektif ianya adalah tidak benar. Program penyaringan di kalangan bayi baru lahir telah mendapati insiden RMS adalah lebih kurang 1:1 400 kelahiran (Rashed 2001). Sejumlah lebih daripada 400 jenis penyakit tergolong dalam kumpulan penyakit RMS ini. Kumpulan utama penyakit RMS ialah gangguan asid organik dalam darah yang disebabkan oleh gangguan metabolisme pada protein, karbohidrat atau lemak; gangguan oksidasi asid lemak atau gangguan oksidasi beta; gangguan asid laktik primer; ketidaknormalan asid amino; gangguan kitaran urea; penyakit metabolisme karbohidrat; penyakit peroksisomal dan penyakit simpanan lisosomal (Scriver et al. 2001).

Penyakit simpanan lisosomal merupakan sekumpulan lebih daripada 40 jenis penyakit genetik manusia yang disebabkan oleh gangguan fungsi lisosom. Penyakit simpanan lisosomal terjadi apabila lisosom tidak dapat berfungsi untuk mendegradasikan makromolekul tertentu kerana ketiadaan enzim yang diperlukan. Longgokan makromolekul tersebut berlaku dalam lisosom yang akan menyebabkan

kematian sel dan tisu, seterusnya terjadilah gangguan fungsi organ dan sistem tubuh yang berkaitan. Pelbagai jenis penyakit simpanan lisosomal ini dapat dikenalpasti melalui jenis makromolekul yang terabit. Penyakit-penyakit yang dikategorikan sebagai penyakit simpanan lisosomal ialah mukopolisakaridosis (MPS), penyakit simpanan lemak, penyakit simpanan glikoprotein, penyakit leukodistrofi, gangliosidosis dan mukolipidosis (Winchester et al. 2000).

MPS adalah sekumpulan penyakit keturunan yang bercirikan longgokan glikoaminoglikan (GAG) bersulfat dalam sel pelbagai jenis tisu. Mc Kusick (1972) menyatakan pesakit MPS kelihatan normal ketika dilahirkan dan membesar seperti biasa untuk beberapa bulan pertama. Gambaran awal penyakit MPS ialah perubahan paras muka yang kasar (dismofik), lidah serta bibir akan kelihatan besar dan tebal, rambut menjadi kasar, kening yang tebal serta lebat (hirsutisme), hidung sentiasa berhingus (rinitis kronik) dan pembesaran fizikal yang terencat. Biasanya pesakit dikesan mengalami kerencatan akal setelah berumur dua tahun dan keatas. Kornea mata menjadi kelabu yang boleh menyebabkan kebutaan juga terjadi dalam sesetengah kes dan pesakit MPS sering menjadi pekak. Ketidaknormalan skeletal yang dikenali sebagai disostosis multiplek, ketidaknormalan bahagian torak dan bahagian atas lumbar menyebabkan pesakit menjadi ketot, juga merupakan ciri MPS. Tapak tangan menjadi pendek dan lebar serta jari-jemari membengkok seperti cakar. Selain daripada itu bahagian abdomen pesakit membuncit disebabkan oleh pembesaran dan pengerasan organ hepar dan limfa. Gambarfoto ketidaknormalan fizikal pesakit MPS ditunjukkan dalam Lampiran A. Komplikasi jantung adalah antara gejala yang terakhir yang dihidapi oleh pesakit MPS. Pengumpulan GAG boleh menyebabkan gangguan fungsi injap jantung dan kegagalan jantung kongestif atau penebalan injap arteri koronari serta infaksi miokardium. Kebanyakan pesakit MPS mati akibat kegagalan jantung dan pneumonia seawal umur 10 tahun (Wraith et al.1987).

Insiden penyakit RMS termasuklah MPS terjadi di serata dunia tanpa mengira kaum tetapi masih dikategorikan sebagai jarang dijumpai kerana ianya agak sukar dikenalpasti ataupun ianya tidak didokumenkan terutamanya di negara-negara Asia (Tan et al. 1995). Jadual 1.1 menunjukkan nama negara-negara dimana kes-kes MPS

pernah direkodkan. Menurut Neufeld dan Muenzer (2001), MPS telah dikesan dengan kekerapan 1:10 000 hingga 18 000 dikalangan bayi yang dilahirkan hidup melalui program penyaringan di kalangan kelahiran baru.

Jadual 1.1 Negara kes MPS pernah direkodkan

Nama negara	Rujukan
China	Chou (1959)
Mesir	Awwad (1961)
Eropah	Winters 1976)
Jepun	Kaibara (1979)
Israel	Scaap (1980)
Belanda	Van de Kamp (1981)
Sweden	Uvebrant (1985)
Afrika	Echenne (1986)
Afrika Selatan	Petersen (1986)
Greece	Beratis (1986)
Itali	Kaplan & Wolfe (1987)
Turki	Sewell et al. (1988); Emre et al. (2002)
Vietnam	Handelman et al.(1989)
Singapura	Tan et al. (1995)

1.2 KEPENTINGAN KAJIAN

Pendiagnosaan MPS adalah berdasarkan gambaran klinikal, kaedah radiografi dan komponen biokimia melalui penyiasatan makmal (Mc Kusick 1969). Oleh kerana kebanyakan pesakit MPS kelihatan normal pada awal kelahirannya (Cleary & Wraith 1995), penyiasatan makmal merupakan cara yang amat berkesan dalam penyaringan awal MPS terutamanya bagi bayi yang berisiko tinggi. Penganalisaan GAG dalam

urin adalah merupakan kaedah terulung dalam pendiagnosaan MPS dan masih digunakan sehingga kini sebagai ujian diagnostik (Scriver et al. 2001). Paras GAG dalam urin pesakit MPS yang tinggi walaupun pada peringkat awal kelahirannya (Berry 1987), memungkinan pengesanan awal penyakit MPS bagi mencegah daripada segala komplikasi yang akan timbul yang mana kebanyakannya mungkin menjadi kekal dan tidak berbalik (Wraith 2005).

Penyiasatan makmal dalam pendiagnosaan MPS dilakukan melalui tiga peringkat iaitu ujian penaksiran, ujian pengasingan dan ujian pengesanan. Ujian penaksiran dan pengasingan dilakukan dengan menganalisa GAG dalam sampel urin manakala ujian pengesanan adalah ujian penaksiran enzim yang terbabit dalam sampel samada serum, plasma, leukosit ataupun kultur sel (Hall et al. 1978; Kresse et al. 1982; van Diggelen et al. 1990; He et al. 1993).

Ujian pengesanan MPS melalui penaksiran enzim didapati rumit dan mahal (Piraud et al. 1993b). Oleh itu tidak semua negara terutamanya negara dunia ke tiga mampu melakukannya. Menurut Leistner dan Giugliani (1998) yang bertugas di sebuah pusat rujukan bagi penyakit penyimpanan lisosomal di Brazil, ujian penaksiran enzim ini terpaksa dilakukan di sebuah hospital di London. Di rantau ini hanya negara Jepun, Australia dan Taiwan diketahui dapat melakukan kesemua ujian tersebut manakala Singapura hanya melakukan dua ujian awal sahaja dengan ujian pengesanan MPS dilakukan samada di Australia ataupun di Taiwan (Tan et al. 2006). Di Malaysia sehingga kini belum ada satu pun institusi yang berupaya mendiagnosa MPS dengan kaedah penaksiran dan pengasingan GAG yang terkini yang lebih mudah, cepat dan boleh dipercayai.

Kajian ini adalah merupakan kajian awal untuk membangunkan dan memantapkan kaedah terkini ujian penaksiran dan pengasingan GAG dalam usaha untuk mengujudkan pusat pendiagnosaan MPS di Malaysia. Kajian ini secara kasarnya dapat menentukan peratus prevalen MPS di Hospital Universiti Sains Malaysia yang akan menjadi pemangkin kepada kajian yang lebih tepat ataupun yang lebih besar skopnya di Malaysia.

Ujian penaksiran GAG jumlah dalam kajian ini dilakukan menggunakan kaedah dimetilmetilina biru (DMB) manakala ujian pengasingan GAG menggunakan kaedah elektroforesis resolusi tinggi (ERT). Sehingga kini belum ada kajian penggunaan dan persetujuan antara kaedah DMB dan kaedah ERT pernah dilakukan. Kajian penggunaan dan persetujuan antara kaedah penaksiran dan kaedah pengasingan GAG yang pernah dilaporkan adalah kaedah kualitatif kertas MPS Ames dan ERT (Huang et al. 1985b), kaedah kuantitatif alsian biru dan kaedah kromatografi lapisan nipis (Dembure et al. 1990; Leistner & Giugliani 1998; Mahalingam et al. 2004), kaedah kuantitatif alsian biru dan ERT (Gallegos-Arreola et al. 2000), kaedah DMB dan elektroforesis dua dimensi (Chuang et al. 2001) dan kaedah kuantitatif alsian biru, elektroforesis satu dimensi dan elektroforesis dua dimensi (Gray et al. 2007). Persetujuan antara kaedah DMB dan kaedah ERT akan diperolehi daripada kajian ini.

1.3 OBJEKTIF UMUM

Untuk menentukan persetujuan antara kaedah dimetilmetilena biru (DMB) dan kaedah elektroforesis resolusi tinggi (ERT).

1.4 OBJEKTIF KHUSUS

- a. Menentukan peratus prevalen MPS berdasarkan kaedah DMB.
- b. Menentukan peratus prevalen MPS berdasarkan kaedah ERT.
- c. Menentukan persetujuan antara kaedah DMB dan kaedah ERT.

1.5 HIPOTESIS KAJIAN

Terdapat persetujuan diantara kaedah DMB dan kaedah ERT (dimana $k=1$)

BAB II

KAJIAN KEPUSTAKAAN

2.1 GLIKOAMINOGLIKAN (GAG)

Istilah glikoaminoglikan (GAG) telah diperkenalkan oleh Jeanloz (1960) bagi menggantikan istilah mukopolisakarida (Meyer et al. 1958). Istilah GAG didapati lebih sesuai dan telah digunakan sehingga sekarang. GAG merupakan kompleks besar bercas negatif rantai karbohidrat yang biasanya bergabung dengan kuantiti kecil protein. GAG merupakan bahan penting yang terdapat dalam tisu penghubung dan dalam bahan asas. GAG mempunyai keupayaan yang tersendiri bagi menampung sejumlah besar molekul air. Ini menjadikan ianya bahan matrik berbentuk gel yang menjadi asas bagi bahan asas tubuh manusia.

Pelbagai tisu penghubung yang terdapat di bahagian kulit, tendon, tulang rawan, ligamen dan bahan matrik dalam tulang; semuanya mengandungi serat protein yang tidak larut yang tersebar dalam bahan asas ini. Sifat tisu penghubung bergantung kepada nisbah relatif antara bahan asas dan serat protein. Contohnya tulang rawan mengandungi sejumlah besar bahan asas manakala tendon lebih mengandungi serat protein. Larutan akuas GAG yang separa cair dan melekit telah menjadikan rembesan mukus bersifat seperti pelincir bahkan dari sinilah nama asal mukopolisakarida diperolehi. Contoh lain peranan khusus bahan asas ialah dalam cecair sinovial yang berfungsi sebagai bahan pelincir dalam sendi dan dalam sarung tendon. GAG boleh diperolehi dalam kuantiti yang besar dalam kulit, tulang rawan, tulang, kornea, salur darah, injap jantung dan tendon manakala organ hepar, otak, leukosit dan sel mast mengandungi GAG dalam kuantiti yang lebih kecil (Balazs & Jeanloz 1966).

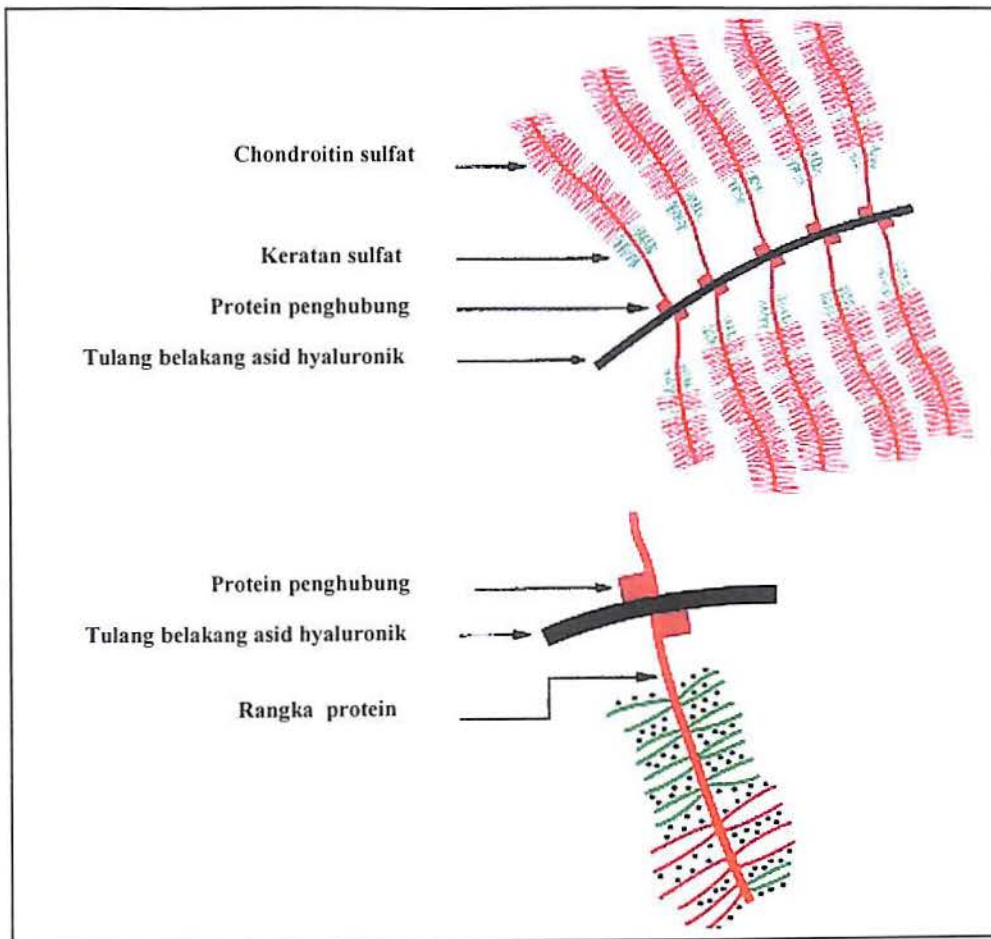
2.1.1 Proteoglikan: Gabungan GAG dan Protein

Rantainya panjang karbohidrat GAG mengandung komponen heteropolisakarida yang tidak bercabang yang terdiri daripada unit disakarida, gula amino dan gula asid yang berulang-ulang. Jenis gula amino adalah samada N-asetilglukosamina (GlcNAc) atau N-asetilgalaktosamina (GalNAc) yang biasanya terasil (acylated). Gula amino ini juga boleh mengandungi molekul sulfat pada karbon 4 (C-4) atau karbon 6 (C-6), ataupun pada nitrogen yang tidak terasil. Jenis gula asid pula ialah samada asid glukuronik (GlcUA), asid iduronik (IdUA) atau galaktosa (Gal) (Telser et al. 1965; Sugahara et al. 1995).

Pada pH fisiologi, kumpulan karboksil pada struktur gula asid ini akan bercas negatif tetapi dengan adanya kumpulan sulfat, GAG akan mempunyai cas negatif yang lebih kuat. Ini akan menyebabkan rantaian heteropolisakarida ini mengembang dalam larutan akuas GAG serta menolak antara satu sama lain dan dalam masa yang sama akan dikelilingi oleh lapisan molekul air. Apabila berada bersebelahan, ianya akan bergerak menggelongsor tanpa geseran sebagai mana dua keping magnet pada polariti yang sama diletakkan bersebelahan. Sifat kelicinan inilah yang ada pada rembesan mukus dan cecair sinovial.

Apabila suatu larutan GAG diberi tekanan, komponen air akan terkeluar dan isipadu GAG yang tertekan menjadi kecil. Bagaimanapun apabila tiada lagi tekanan diberikan, GAG akan kembali ke saiz asal dan menarik semula komponen air melalui peranan cas negatifnya. Ciri unik ini menyumbang kepada ketahanan dalam cecair sinovial dan cecair pada mata. Semua rantaian polisakarida pada GAG didapati bergabung secara kovalen pada struktur protein membentuk monomer proteoglikan, kecuali pada asid hyaluronik. Monomer proteoglikan yang terdapat pada tulang rawan adalah terdiri daripada rantaian karbohidrat yang terikat secara kovalen kepada struktur rangka protein. Rantainya-rantainya karbohidrat yang boleh berjumlah lebih daripada 100 unit ini, terjulur keluar daripada rangka protein secara selari dengan terpisah baik disebabkan oleh cas negatif masing-masing dan menghasilkan struktur yang dipanggil 'berus botol'. Jenis GAG yang terdapat dalam proteoglikan tulang rawan ialah chondroitin sulfat (CS) dan keratan sulfat (KS). Rantainya karbohidrat dan

rangka protein disambungkan oleh satu molekul triheksos (galaktosa-galaktosa-xilosa) pada hujung karbohidrat dan hujung serina pada rangka protein tadi (Hoffmann et al. 1967; Mankin & Lipiello 1971; Choi & Meyer 1975; Nilsson et al. 1983). Contoh struktur proteoglikan adalah seperti dalam Rajah 2.1.



Rajah 2.1 Contoh struktur proteoglikan pada tulang rawan

Sumber: Sly 1980

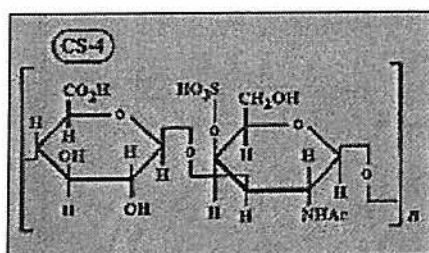
2.1.2 Jenis GAG

Lima jenis GAG yang terlibat dalam penyakit MPS iaitu chondroitin sulfat (CS), dermatan sulfat (DS), heparan sulfat (HS), keratan sulfat (KS) dan hyaluronan. Jenis GAG ini ditentukan oleh komposisi monomer iaitu gula asid dan gula amino, jenis ikatan glikosidik serta kekuatan dan kedudukan unit sulfat. Kandungan jenis gula asid

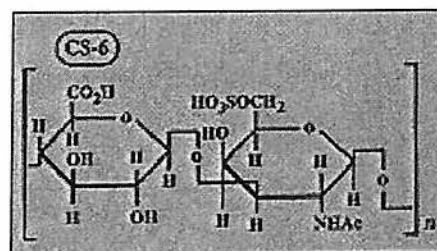
dan gula amino yang terkandung di dalamnya samada GlcUA , IdUA atau Gal dan GalNAc atau GlcNAc. Jadual 2.1 menunjukkan jenis GAG dan ciri-cirinya.

a. Chondroitin sulfat (CS)

Jenis GAG yang utama pada manusia ialah CS. Contohnya dalam tulang rawan, CS merupakan 80% daripada jumlah GAG. Molekul ini mengandungi unit disakarida, GlcUA dan GalNAc. Satu rantai CS dalam tulang rawan mengandungi antara 25 hingga 40 unit disakarida ini dengan berat molekulnya antara 12 hingga 20 kDa. Disakarida ini kerap tersulfat pada kedudukan 4 atau 6 pada unit gula amino, GalNAc. Struktur subjenis chondroitin 4-sulfat (CS-4) dan subjenis chondroitin 6-sulfat (CS-6) ditunjukkan dalam Rajah 2.2 dan 2.3. Bagaimanapun unit yang tidak tersulfat dan unit tersulfat dalam bentuk disulfat dan trisulfat, boleh dijumpai. Kepentingan kedudukan kumpulan sulfat ini masih tidak diketahui. Mourao et al. (1976) dan Saamanen et al. (1989) dalam kajian mereka mendapati nisbah subjenis CS-6 adalah lebih tinggi daripada subjenis CS-4 dalam tulang rawan. CS-4 berkemungkinan adalah komponen yang penting dalam proses kalsifikasi manakala CS-6 adalah berkait dengan integriti permukaan artikular (Mourao et al. 1976). Rantai CS terikat pada tulang protein melalui unit trisakarida xilosa-galaktosa-galaktosa dan unit xilosa terikat pada unit serina pada protein penghubung.



Rajah 2.2 Struktur asas chondroitin 4-sulfat.



Rajah 2.3 Struktur asas chondroitin 6-sulfat.

Sumber : Sly 1980

Jadual 2.1 Jenis dan ciri GAG

Nama	Gula asid	Gula amino	Ikatan glikosidik	Unit sulfat (per mol disakarida)	Kedudukan molekul sulfat	Ciri khas
Chondroitin sulfat	GlcUA	GalNAc	beta (1,3)	1	C-4 atau C-6 pada GalNAc	Merupakan jenis GAG yang utama
Dermatan sulfat	IdUA atau GlcUA	GalNAc	beta (1,3)	1.2 – 1.4	C-4 pada GalNAc atau C-2 pada IdUA	Satu-satunya GAG yang mengandungi IdUA
Keratan sulfat	Gal	GlcNAc	beta (1,4)	1.1 – 1.3	C-6 pada GlcNAc	Sangat bervariasi
Heparan sulfat	GlcUA	GlcNAc	alpha (1,4)	0.5 – 1.5	C-6 pada GlcNAc	Mempunyai ketumpatan cas negatif yang tinggi
Hyaluronan	GlcUA	GlcNAc	beta (1,3)	Tiada	Tiada	Satu-satunya GAG yang tidak bersulfur

Sumber : Sly 1980