

**'n Moontlike defek in melanienbiosintese by 'n pasiënt
met die simptome van hipopigmentering en die
verdonkering van liggaamsvloeistowwe**

deur

Manda Solomon

**Verhandeling voorgelê as gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die
graad**

Magister Scientiae in Biochemie

**in die Fakulteit Natuurwetenskappe
Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys
Potchefstroom**

November 1998

**'n Moontlike defek in melanienbiosintese by 'n pasiënt met die
simptome van hipopigmentering en die verdonkering van
liggaamsvloei-stowwe.**

deur

Manda Solomon

**Leier: Mnr. E. Erasmus
Hulpleier: Prof. L.J. Mienie**

**Departement Biochemie
Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys**

Graad: Magister Scientiae

November 1998

*" O diepte van die rykdom en wysheid
en kennis van God !
Hoe ondeurgrondelik is Sy oordele,
Hoe onnaspeurlik sy weë !
Wie ken die bedoeling
van die Here?
Wie gee Hom raad ?
Wie bewys Hom 'n guns,
sodat Hy verplig is om iets
terug te doen ?
Uit Hom en deur Hom en tot Hom
is alle dinge
Aan Hom behoort die heerlikheid
tot in ewigheid
Amen."*

Romeine 12 :33-36

Aan my ouers,
Met liefde

Inhoudsopgawe

Inhoudsopgawe	i
Abstract	xv
Opsomming	xviii
Bedankings	xxi
Hoofstuk 1	1
Inleiding	1
Hoofstuk 2: Literatuuroorsig	3
2.1 Inleiding	3
2.2 Melanien en die funksies daarvan	4
2.3 Die melanosiete	5
2.4 Melanosome	6
2.4.1 Die voorkoms en grootte van melanosome	6
2.4.2 Die vorming en melanisering van die melanosome	7
2.4.3 Melanosomale oordrag na en voorkoms in keratinosiete	9
2.5 Melanienbiosintese in die vel, oë en hare	9
2.6. Die melanien biosinteseveg	11
2.6.1. Eumelanogenese	12
2.6.2. Die polimerisering na en struktuur van eumelanien	13
2.6.3. Feomelanogenese	16
2.6.4. Die wyse van polimerisering na en die struktuur van feomelanien	17
2.6.5. Faktore wat 'n rol speel in die regulering van die melanien biosinteseveg	17

2.7. Melanienverwante metaboliete	18
2.7.1. Inleiding	18
2.7.2. Melanienverwante metaboliete as merkers van melanosiet aktiwiteit	20
2.7.3. Melanienverwante metaboliete en die verdonkering van liggaamsvloeistowwe	23
2.8. Hipopigmentering	24
2.8.1. Inleiding	24
2.8.2. Die verskillende vorme van okulokutaneuse albinisme (OKA)	25
(a) Mutasies van die c-lokus	25
(b) Mutasies in die p-geen	28
(c) Mutasies in die Lyst geen	28
(d) Vorme van OKA waarvoor die genetiese defek onbekend is	28
2.8.3. Chediak-Higashi sindroom	32
2.9. Samevatting	33
Hoofstuk 3 : Motivering, doelstellings en benaderingswyse	34
3.1. Inleiding	34
3.2. Navorsingsmateriaal	34
3.2.1. Beskrywing van die kliniese geskiedenis van die pasiënt	34
3.2.2. Die familieagtergrond van die pasiënt	39
3.2.3. 'n Kritiese beskouing van die kliniese geskiedenis van die pasiënt	39
3.3. Motivering vir hierdie ondersoek	44

3.4. Die doelwitte van hierdie ondersoek	46
3.5. Die benaderingswyse tot hierdie ondersoek	47
Hoofstuk 4 Eksperimentele metodes	48
4.1. Die ultrastrukturele ondersoek van haarwortel melanosiete en keratinosiete	48
4.1.1. Die voorbereiding van materiaal vir elektronmikroskopiese ondersoek	48
4.1.2. Aantoning van melanosiete en keratinosiete in die weefselsnitte	50
4.2. Onderzoek oor liggaamsvloeistofverdonkering	51
4.2.1. Die hantering van fisiologiese monsters	51
4.2.2. Siftingstoets vir die ondersoek van moontlike oorsake van liggaamsvloeistofverdonkering	51
(a) Algemene sifting	51
(b) Toets vir verhoogde vlakke van indoliese melanogene	52
(c) Toets vir urobilien	52
(d) Toets vir verhoogde urobilinogeen en porfobilinogeen	53
(e) Toets vir verhoogde hemoglobien of mioglobien	53
(f) Toets vir vrye porfiriene	54
(g) Toets vir homogentisiensuur	54
(h) Die ysterchloriedtoets	55
(i) Toets vir verhoogde indoksielsulfaat (indikan)	55
4.2.3. Die bepaling van die kreatinienwaarde van urienemonsters	55
4.2.4. Organiese suur analise	56
4.2.5. Die kwantifisering van urinêre aminosure deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie	58

4.2.6. Sintese en suiwing van 'n indoliese melaniën metaboliet	59
(a) Sintese van 6H5MI2K	59
(b) Bevestiging van die identiteit van die gesintetiseerde 6H5MI2K	60
4.2.7. Die sintese en suiwing van die fenoliese melaniënverwante metaboliet, 5SSD	60
(a) Sintese van 5SSD	60
(b) Suiwing en bevestiging van die identiteit van die gesintetiseerde 5SSD	61
4.2.8 Die kwantifisering van 5SSD, L-DOPA en DA deur middel van HPLC met elektrochemiese deteksie	62
4.2.9 Die kwantifisering van melaniënverwante metaboliete in uriene deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie	63
(a) Die vasstel van die optimale kondisies vir ES-MS analise van L- DOPA, DA, OMD, α -metiëldopa en 5SSD	63
(b) Die ekstraksie van L-DOPA, DA, OMD en 5SSD uit uriene deur middel van aluminiumoksied	64
(c) Die kwantifisering van L-DOPA, DA, OMD en 5SSD na alumina ekstraksie	65
(d) Die kwantifisering van DA, L-DOPA en OMD deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie na derivatisering met butanoliese HCl	67
(e) Die kwantifisering van DA, 5SSD en 6H5MI2K in uriënemonsters na derivatisering met butanoliese HCl by minder drastiese kondisies	70

4.2.10. Analise van die onbekende verbindings in die vlekke op die pasiënt se klere	70
(a) Oplos van die onbekende verbindings in die vlekke op die pasiënt se klere	70
(b) Die ekstraksie en gaschromatografiese analise van die onbekende verbindings uit die vlekke op die klere	71
(c) Analise van die onbekende verbindings deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie	72

Hoofstuk 5 : 'n Ultrastrukturele ondersoek van die haarwortel melanosiete van die pasiënt

5.1. Inleiding	74
5.2. Die ultrastrukturele kenmerke van melanosiete en keratinosiete by Chediak-Higashi sindroom albinisme	75
5.3. Resultate	76
5.3.1 Melanosome in korteks en medullêre selle van die hare van die pasiënt	76
5.3.2 'n Kortekssel in 'n haarwortel van die pasient na L-DOPA inkubasie	79
5.3.3 Melanosome in 'n kortekssel na L-DOPA inkubasie	80
5.3.4 Melanosiete in die haarwortels van die pasiënt na L-DOPA inkubasie	81
5.3.5 Melanosome in die melanosiete van die haarwortels na L-DOPA inkubasie	82
5.4 Samevatting	84

Hoofstuk 6 : Onderzoek oor liggaamsvloei-stofverdonkering	86
6.1 Inleiding	86
6.2. Resultate	88
6.2.1. Siftingstoetse	88
6.2.2. Die konsentrasie van organiese sure in die urienemonsters van die pasiënt	89
6.2.3. Die konsentrasie van aminosure in die verskillende urienemonsters van die pasiënt	99
6.2.4. Die analise van 'n indoliese melaniën metabooliet, 6H5MI2K	103
6.2.5. Die sintese en suiwering van 5SSD	104
6.2.6. Die kwantifisering van, L-DOPA, DA en 5SSD in urienemonsters deur middel van HPLC met elektrochemiese deteksie	105
6.2.7. Die kwantifisering van melaniënverwante metabooliete in uriene deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie	106
(a) Optimalisering van die kondisies vir die elektrospoei-massaspektrometriese waarneming van L-DOPA, DA, 5SSD, OMD en α -metiëldopa (interne standaard)	106
(b) Kwantifisering van melaniënverwante metabooliete in uriene na alumina ekstraksie	113
(c) Kwantifisering van melaniënverwante metabooliete in urienemonsters na derivatisering met butanoliese HCl	115
(d) Die kwantifisering van DA, 5SSD en 6H5MIK in urienemonsters na droging en butiëling by minder drastiese kondisies	120
6.2.8. GC-MS en ES-MS analise van die verbindings in die vlekke op die pasiënt se klere	126
6.3. Samevatting.	127

Hoofstuk 7 : Bespreking	130
7.1. Bespreking van die ultrastrukturele ondersoek	130
7.2. Bespreking van die ondersoek na die oorsprong van liggaamsvloeistofverdonkering by die pasiënt	131
7.3. Samevatting	136
Bibliografie	137
Afkortingslys	160
Glossarium	164

Lys van figure	Bl.
<u>Figuur 2.1</u> Lengtesnit deur 'n haarwortel	5
<u>Figuur 2.2</u> Die ontwikkelingsfases van eu- en feomelanosome	8
<u>Figuur 2.3</u> Die voorkoms van die haarwortel gedurende die hoof groeifases van die haar	10
<u>Figuur 2.4</u> Die melanien biosintese-weg	11
<u>Figuur 2.5</u> Dimere wat vorm tydens die oksidasie van DHI	13
<u>Figuur 2.6</u> Oligomere wat vorm tydens die oksidasie van DHIK	14
<u>Figuur 2.7</u> Die kruiskoppelingsproduk van DHI en DHIK	15
<u>Figuur 2.8</u> Gedeeltelik gedegradeerde oligomere wat vorm tydens die polimerisering na eumelanien	16
<u>Figuur 2.9</u> Oligomere wat vorm tydens die oksidasie van 5SSD na feomelanien	17
<u>Figuur 2.10</u> Die metabolisme van OMD	19
<u>Figuur 2.11</u> Die kataboliese weë van DA, epinefrien en norepinefrien	22

<u>Figuur 5.1</u>	Die voorkoms van die reuse melanosome in die melanosiete van persone met Chediak-Higashi sindroom	76
<u>Figuur 5.2</u>	Fase 2 en vroeë fase 3 premelanosome	77
<u>Figuur 5.3</u>	Vroeë fase 3 premelanosome	77
<u>Figuur 5.4</u>	Desmosoom en fase 3 premelanosoom	78
<u>Figuur 5.5</u>	Haarwortel kortekssel na L-DOPA inkubasie	79
<u>Figuur 5.6</u>	Melanosoomaggregaat van fase 4 melanosome	80
<u>Figuur 5.7</u>	Melanosoomaggregaat van melanosome van verskeie ontwikkelingsfases	80
<u>Figuur 5.8</u>	Haarwortel melanosiete na L-DOPA inkubasie	81
<u>Figuur 5.9</u>	Melanosome van verskeie ontwikkelingstadia	82
<u>Figuur 5.10</u>	Melanosome van ontwikkelingsfases 3 en 4	83
<u>Figuur 5.11</u>	Vesikel-bevattende organel tussen melanosome van verskeie ontwikkelingstadia	83
<u>Figuur 5.12</u>	Nader aansig van die vesikel-bevattende organel	84
<u>Figuur 6.1(a)</u>	Die absorpsiespektrum van uriene van die pasiënt na uitvoering van die Thormählen reaksie	89

<u>Figuur 6.1(b)</u>	Die absorpsiespektrum van die positiewe kontrole, indool, na uitvoer van die Thormählen reaksie	89
<u>Figuur 6.2</u>	Die HVA konsentrasies in spesifieke urienemonsters van die pasiënt	91
<u>Figuur 6.3</u>	Die gemiddelde HVA konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	91
<u>Figuur 6.4</u>	DOPAC konsentrasies in die urienemonsters van die pasiënt	92
<u>Figuur 6.5</u>	Die gemiddelde DOPAC konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	93
<u>Figuur 6.6</u>	VLA konsentrasies in die urienemonsters van die pasiënt	94
<u>Figuur 6.7</u>	Die gemiddelde VLA konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	94
<u>Figuur 6.8</u>	VMA konsentrasies in die urienemonsters van die pasiënt	96
<u>Figuur 6.9</u>	Die gemiddelde VMA konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	96
<u>Figuur 6.10</u>	4-HFA konsentrasies in die urienemonsters van die pasiënt	97
<u>Figuur 6.11</u>	4-HFL konsentrasies in urienemonsters van die pasiënt	98

<u>Figuur 6.12</u>	Die gemiddelde konsentrasie 4-HFA in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	98
<u>Figuur 6.13</u>	Die gemiddelde konsentrasie 4-HFL in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	99
<u>Figuur 6.14</u>	Die vlakke van tirosien in die uriene van die pasiënt	100
<u>Figuur 6.15</u>	Die gemiddelde konsentrasie tirosien in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	100
<u>Figuur 6.16</u>	Die vlakke van fenielalanien in die uriene van die pasiënt	101
<u>Figuur 6.17</u>	Die gemiddelde konsentrasie fenielalanien in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	101
<u>Figuur 6.18</u>	Die vlakke van triptofaan in die uriene van die pasiënt	102
<u>Figuur 6.19</u>	Die gemiddelde konsentrasie triptofaan in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	102
<u>Figuur 6.20</u>	Massaspektrum van die gesintetiseerde 6H5MI2K	103
<u>Figuur 6.21(a)</u>	Die aanvanklike absorpsiespektrum van die 5SSD sintetiese ensiemreaksiemengsel	104
<u>Figuur 6.21(b)</u>	Die absorpsiespektrum van die 5SSD sintetiese reaktiemengsel na verloop van die ensiemreaksie	104
<u>Figuur 6.22</u>	Dogterioon skanderingsprofiel van α -metioldopa	107

<u>Figuur 6.23</u>	Dogterioon skanderingsprofiel van L-DOPA	108
<u>Figuur 6.24</u>	Dogterioon skanderingsprofiel van DA	108
<u>Figuur 6.25</u>	Dogterioon skanderingsprofiel van OMD	109
<u>Figuur 6.26</u>	Dogterioon skanderingsprofiel van 5SSD	109
<u>Figuur 6.27 (a)</u>	Standaardkurwe van L-DOPA	111
<u>Figuur 6.27 (b)</u>	Standaardkurwe van DA	111
<u>Figuur 6.27 (c)</u>	Standaardkurwe van OMD	112
<u>Figuur 6.28 (a)</u>	Die ekstraksie van L-DOPA uit urienemonsters deur middel van alumina	113
<u>Figuur 6.28 (b)</u>	Die ekstraksie van DA uit urienemonsters deur middel van alumina	114
<u>Figuur 6.28 (c)</u>	Die ekstraksie van OMD uit urienemonsters deur middel van alumina	114
<u>Figuur 6.29 (a)</u>	Die standaardkurwe van L-DOPA	116
<u>Figuur 6.29 (b)</u>	Die standaardkurwe van OMD	116
<u>Figuur 6.29 (c)</u>	Die standaardkurwe van DA	117

<u>Figuur 6.30 (a)</u> Die konsentrasie van L-DOPA in die urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone	118
<u>Figuur 6.30 (b)</u> Die gemiddelde konsentrasie L-DOPA in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	118
<u>Figuur 6.31 (a)</u> Die OMD konsentrasie in die urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone	119
<u>Figuur 6.31 (b)</u> Die gemiddelde konsentrasie OMD in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	119
<u>Figuur 6.32</u> DA standaardkurwe	120
<u>Figuur 6.33</u> Dogterioon skanderingsprofiel van 6H5MI2K na derivatisering	121
<u>Figuur 6.34</u> Massaspektrum van gebutieleerde 5SSD	122
<u>Figuur 6.35 (a)</u> Die konsentrasie DA in die urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone	123
<u>Figuur 6.35 (b)</u> Die gemiddelde konsentrasie DA in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	124
<u>Figuur 6.36 (a)</u> Die konsentrasie 5SSD in die urienemonster van die pasiënt en kontrolepersone	124
<u>Figuur 6.36 (b)</u> Die gemiddelde konsentrasie 5SSD in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke	125

<u>Figuur 6.37 (a)</u>	Die konsentrasie 6H5MIK in die urienemonster van die pasiënt en kontrolepersone	125
<u>Figuur 6.37 (b)</u>	Die gemiddelde konsentrasie 6H5MIK in urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone	126
Lys van tabelle		Bl.
<u>Tabel 2.1</u>	Die kenmerke van vorme van OKA veroorsaak deur mutasies binne die tirosinase geen.	27
<u>Tabel 2.2</u>	Die hoof onderskeidende kenmerke van die verskillende vorme van OKA	30
<u>Tabel 3.1</u>	Die kliniese geskiedenis van die pasiënt	35
<u>Tabel 4.1</u>	Massaspektrometriese kondisies vir die waarneming van L-DOPA, DA, OMD, α -metioldopa en 5SSD	64
<u>Tabel 4.2</u>	Massaspektrometriese skandering vir DA en 6H5MI2K	69
<u>Tabel 4.3</u>	Massaspektrometriese skandering vir L-DOPA, OMD, 5SSD en D ₁₀ -isoleusien	69
<u>Tabel 6.1</u>	IONE waarvoor geskandeer is vir die kwantifisering van L-DOPA, DA, 5SSD en OMD in uriene	110

Abstract

A possible defect in melanin biosynthesis in a patient with the symptoms of hypopigmentation and the darkening of body fluids

Many congenital metabolic defects present certain characteristic clinical and biochemical features in affected persons. Investigation of the clinical and biochemical characteristics of a person with a possible metabolic defect is an important aid in the diagnosis of a metabolic disease. In this study certain symptoms, indicating a defect in melanin biosynthesis, of a patient were investigated. The patient presents both the symptoms of hypopigmentation and the sporadic darkening of body fluids. Both these symptoms might be caused by a defect in melanin biosynthesis. In this study these two symptoms were investigated to determine whether they could be associated with a defect in melanin biosynthesis.

The hypopigmentation and other clinical features of the patient resemble the clinical characteristics of Chediak Higashi syndrome, a type of oculocutaneous albinism. The first main goal of this investigation was to determine if the patient had Chediak Higashi syndrome. Chediak Higashi syndrome is caused by mutations in a single gene called the Lyst gene. Mutations in this gene leads, among other defects, to abnormalities in the synthesis and development of melanosomes, the organelles in which melanin is produced. Chediak Higashi syndrome is characterised by the pigment cells in affected persons containing giant melanosomes. The hair root pigment cells and keratinocytes of the patient were investigated by transmission electronmicroscopy. By this ultrastructural investigation it was determined that the patient is unlikely to have Chediak Higashi syndrome, because no giant melanosomes could be observed in the hair root pigment cells or keratinocytes of the patient. An atypical presentation of Chediak Higashi syndrome cannot however be ruled out and it is possible that

the patient has an atypical mutation in the Lyst gene. A definitive answer may be obtained by mutation analysis of the Lyst gene in the patient.

Any condition or treatment which leads to an increase in the levels of melanin related metabolites in urine or saliva can cause the darkening of these body fluids by the polymerization of melanin precursors to the pigment melanin. The second main goal of this study was to determine whether raised levels of melanin related metabolites are responsible for the sporadic darkening of urine, saliva and perspiration of the patient. The melanin related metabolites 5-S-cysteinyl-dopa (5SSD), 6-hydroxy-5-methoxy-indole-2-carboxylic acid (6H5MI2K), 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), O-methyldopa (OMD), dopamine (DA) and tyrosine were quantified in the urine by electrospray mass spectrometry. The following organic acid products of the catabolism of L-DOPA, DA and OMD were quantified in urine by gas chromatography-mass spectrometry: homovanillic acid (HVA), dihydroxyphenylacetate (DOPAC), 3-methoxy-4-hydroxyphenyllactate (VLA) and 4-hydroxy-3-methoxymandelic acid (VMA). Two alternative metabolites of tyrosine, the beginning substrate of the melanin biosynthetic pathway, were also quantified in urine by gas chromatography-mass spectrometry. Quantification of all these metabolites were performed in urine collected during periods of body fluid darkening, periods that darkening didn't take place and periods during which the dose of L-DOPA medication of the patient was reduced. This made it possible to determine whether body fluid darkening could be associated with the urinary levels of certain compounds and to determine the influence of medication on the results of quantification.

From the investigation it was evident that there is a distinct association between the darkening of body fluids and the urinary concentration of OMD and to a lesser extent the urinary concentration of L-DOPA. No association between the darkening of body fluids and the other compounds which were quantified could be found. OMD is the main metabolite of the Sinemet medication taken by the

patient. From this investigation it was evident that the darkening of body fluids is related to raised levels of melanin related metabolites in the body fluids. The raised levels of melanin related metabolites in the body fluids of the patient were however related to the medication taken by the patient rather than to a defect in the melanin biosynthetic pathway.

Opsomming

'n Moontlike defek in melanienbiosintese by 'n pasiënt met die simptome van hipopigmentering en die verdonkering van liggaamsvloei-stowwe

Baie aangebore metaboliese defekte vertoon kenmerkende kliniese en biochemiese eienskappe in geaffekteerde persone. Onderzoek van die kliniese en biochemiese kenmerke van 'n persoon met 'n moontlike metaboliese defek is 'n belangrike middel in die diagnose van 'n metaboliese siektetoestand. In hierdie studie is sekere simptome, wat heenwys na 'n defek in melanienbiosintese, by 'n pasiënt ondersoek. Beide die simptome van hipopigmentering en die sporadiese verdonkering van liggaamsvloei-stowwe kom by die pasiënt voor. Vanuit die literatuur is vasgestel dat beide bogenoemde simptome moontlik die gevolg kan wees van 'n defek in melanienbiosintese. In hierdie studie is ondersoek of hierdie twee simptome wel verband hou met 'n defek in melanienbiosintese.

Die hipopigmentering en ander kliniese eienskappe van die pasiënt toon ooreenstemming met die kliniese kenmerke van Chediak-Higashi sindroom, 'n vorm van okulokutaneuse albinisme. Die eerste hoof doelwit van hierdie ondersoek was om vas te stel of die pasiënt wel Chediak-Higashi sindroom het. Chediak-Higashi sindroom word veroorsaak deur mutasies in 'n enkele geen genaamd die Lyst geen. Mutasies in hierdie geen lei, onder ander defekte, tot abnormaliteite in die sintese en ontwikkeling van die melanosome, die organelle waarin pigment geproduseer word. Die voorkoms van reuse melanosome in die pigmentselle van geaffekteerde persone is 'n kenmerk van Chediak-Higashi sindroom. Die haarwortelpigmentselle en keratinosiete van die pasiënt is ondersoek deur middel van transmissie-elektronmikroskopie. Vanuit die ultrastrukturele ondersoek is vasgestel dat die pasiënt heel moontlik nie Chediak-Higashi sindroom het nie, aangesien geen reuse melanosome in die

haarwortelpigmentselle of keratinosiete waargeneem kon word nie. 'n Atipiese vorm van Chediak-Higashi sindroom kan egter nie uitgesluit word nie. Dit is moontlik dat die pasiënt 'n atipiese mutasie in die Lyst geen het. 'n Definitiewe antwoord kan verkry word deur mutasie analyses uit te voer op die Lyst geen in die pasiënt.

Enige toestand of behandeling wat lei tot 'n verhoging in die vlakke van melaniënverwante metaboliete in uriene en speeksel, kan veroorsaak dat hierdie liggaamsvloeistowwe verdonker weens polimerisering van melaniën voorgangers na die pigment melaniën. Die tweede hoof doelwit van hierdie studie was om vas te stel of verhoogde vlakke van melaniënverwante metaboliete verantwoordelik is vir die sporadiese verdonkering van uriene, speeksel en sweet wat by die pasiënt waargeneem word. Die melaniënverwante verbindings 5-S-sisteïeniëldopa (5SSD), 6-hidroksi-5-metoksi-indool-2-karboksiëlsuur (6H5MI2K), 3,4-dihidroksifenielalanien (L-DOPA), dopamien (DA), 3-O-metiëldopa (OMD) en tirosien is gekwantifiseer in die uriene deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie. Die volgende organiese sure, afkomstig van die katabolisme van L-DOPA, DA en OMD, is gekwantifiseer in die uriene van die pasiënt deur middel van gaschromatografie-massaspektrometrie: homovanilliënsuur (HVA), dihidroksifenielasetaat (DOPAC), 3-metoksi-4-hidroksifenielaktaat (VLA) en 4-hidroksi-3-metoksi-amandelsuur (VMA). Twee alternatiewe metaboliete van tirosien, die beginsubstraat van die melaniën biosintese-weg, is ook gekwantifiseer in die uriene deur middel van gaschromatografie-massaspektrometrie. Kwantifisering van al die bogenoemde verbindings is gedoen in uriene afkomstig van tye dat liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het, tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie en tye dat die dosis L-DOPA medikasie van die pasiënt verlaag is. Sodoende kon vasgestel word of die urinêre vlakke van sekere verbindings verband hou met liggaamsvloeistofverdonkering en watter invloed die medikasie van die pasiënt het op die resultate van die kwantifisering.

Vanuit die ondersoek oor liggaamsvloeistofverdonkering is vasgestel dat liggaamsvloeistofverdonkering 'n duidelike verband toon met die urinêre OMD konsentrasie en tot 'n mindere mate met die urinêre L-DOPA konsentrasie. Geen assosiasie tussen liggaamsvloeistofverdonkering en die urinêre konsentrasie van die ander verbindinge wat gekwantifiseer is, is gevind nie. OMD is die hoof metaboliet van die Sinemet medikasie wat die pasiënt neem. Vanuit die ondersoek van liggaamsvloeistofverdonkering is dus vasgestel dat liggaamsvloeistofverdonkering wel verband hou met verhoogde vlakke van melaniënverwante metaboliete in die liggaamsvloeistowwe. Hierdie verhoogde vlakke van melaniënverwante metaboliete in die liggaamsvloeistowwe van die pasiënt hou egter eerder verband met die medikasie wat die pasiënt neem as met 'n defek in die melaniën biosintese-weg.

Bedankings

Ek wil graag die volgende persone bedank wat die afhandel van hierdie studie moontlik gemaak het:

Bo alles aan my **Hemelse Vader**, vir die geleentheid wat Hy aan my gebied het,

Mabal, die pasiënt oor wie die studie handel en haar ouers.

Mnr. E. Erasmus, my studieleier, vir motivering en raad tydens die duur van die studie,

Prof. L.J. Mienie, vir raad met veral die uitvoer van chemiese sinteses en analyses.

Prof. Pretorius by die biochemie departement, vir raad en hulp met die skryf van die verhandeling

Karin Vergeer, vir al jou vriendskap, opoffering en staatsmaker hulp selfs oor 'n afstand,

My vriende en familie, vir liefde en motivering,

Jacques, vir al jou aanmoediging, liefde en hulp,

Almal by die **Biochemie Departement** vir hul belangstelling, en

Die **SNO** vir finansiële hulp.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Die aangebore defekte van metabolisme kan gedefiniër word as geneties bepaalde biochemiese defekte wat die gevolg is van spesifieke, aangebore defekte in die struktuur of funksie van proteïenmolekules betrokke by metaboliese prosesse (Bondy & Rosenberg, 1969; Beaudet *et al.*, 1989). Baie van die aangebore metaboliese defekte vertoon sekere kenmerkende kliniese en patologiese eienskappe in geaffekteerde persone (Benson & Fensom, 1985). Hierdie kenmerkende eienskappe van 'n metaboliese defek is 'n uiters waardevolle middel in die diagnose van 'n metaboliese siektetoestand (Whitby *et al.*, 1984; Marshall, 1992; Walmsley & White, 1994).

Sekere kenmerkende kliniese eienskappe speel ook 'n belangrike rol in die diagnose van sommige defekte in melanienbiosintese (Kinnear *et al.*, 1985). Melanien, die komplekse, polimeriese verbinding wat verantwoordelik is vir die pigmentasie van verskeie liggaamsdele by die mens en verskeie dierspesies (Seraglia *et al.*, 1993), word gesintetiseer langs multistap metaboliese weë in die liggaam (Martin *et al.*, 1985). Verskeie ensieme en reguleringsfaktore speel 'n rol in hierdie metaboliese weë. Die onderliggende beheermeganismes betrokke by melanienbiosintese is kompleks (King *et al.*, 1995) en die wyse waarop sekere stappe in die metaboliese weë plaasvind is nie duidelik nie (Constantini *et al.*, 1990). Verskeie aangebore siektetoestande waarby 'n afwyking voorkom in die melanien biosintesisisteen is reeds by die mens en verskeie diersoorte geïdentifiseer (Ortonne *et al.*, 1983). By sommige van hierdie toestande is die onderliggende metaboliese of strukturele defek onbekend, maar pasiënte toon sekere eienskappe wat heenwys na 'n onderliggende defek wat melanienbiosintese nadelig beïnvloed (King *et al.*, 1995). Daar bestaan duidelik 'n behoefte aan groter insig in die wyse waarop melanienbiosintese

plaasvind en gereguleer word asook in die onderliggende defekte wat die oorsaak is van siektetoestande waar melanienbiosintese beïnvloed word.

In hierdie studie is sekere eienskappe wat heenwys na 'n defek in melanienbiosintese by 'n pasiënt ondersoek. 'n Rare assosiasie van verskeie simptome kom by die pasiënt voor. Veral die assosiasie van hipopigmentering met verdonkering van liggaamsvloeistowwe is raar (Witkop, 1979; Ortonne *et al.*, 1983; Witkop *et al.*, 1989; King *et al.*, 1995). 'n Nadere ondersoek van sommige van die simptome van die pasiënt is uitgevoer. In hoofstuk 3 van hierdie verhandeling word die kliniese beeld van die pasiënt uiteengesit asook die benaderingswyse wat gevolg is om sekere simptome van die pasiënt te ondersoek. Ook die motivering vir hierdie ondersoek en die hoof doelstellings daarvan word duidelik uiteengesit in hoofstuk 3.

Aangesien verskeie van die pasiënt se simptome gedui het op 'n defek in melanien metabolisme is besluit om in hierdie ondersoek veral te fokus op die moontlikheid dat haar simptome die gevolg mag wees van 'n defek in melanienbiosintese. In hoofstuk 2 van hierdie verhandeling word die verskillende metaboliese en strukturele fasette van die melanien biosintesisisteem uiteengesit en die siektetoestande wat voortspruit uit 'n defek in melanienbiosintese word kortliks bespreek.

In hoofstuk 4 is die eksperimentele metodes gevolg in hierdie studie uiteengesit. In hoofstuk 5 en 6 word die resultate, wat verkry is deur 'n ondersoek van sekere fasette van die kliniese beeld, weergegee en bespreek. Ten slotte is hoofstuk 7 'n samevattende bespreking van die resultate van hierdie ondersoek.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 INLEIDING

Melaniene is pigmente wat verskeie belangrike funksies in die menslike liggaam vervul (Witkop *et al.*, 1989; Hearing & Tsukamoto, 1991; Aroca *et al.*, 1992). Die biosintetiese sisteem waarin melanien vervaardig word bestaan uit verskeie komponente, onder andere die selle en organelle waarin melanienbiosintese plaasvind asook die metaboliese weë waarlangs melanien gesintetiseer word (Ortonne *et al.*, 1983). Defekte in enige van hierdie fasette van die melanien biosintesesisteem kan lei tot 'n verskeidenheid verskynsels, onder andere abnormale pigmentasie van die liggaam en afwykings in die vlakke van melanienverwante metaboliete in die uriene en serum (Witkop, 1983; Hansson, 1988). Heelwat vorme van hipopigmentering het hul oorsprong in defekte van die melanien biosintesesisteem (Ortonne *et al.*, 1983). Hierdie ondersoek handel oor 'n pasiënt wat verlaagde pigmentasie vertoon asook simptome wat heenwys na die moontlikheid dat abnormaliteite voorkom in die vlakke van melanienverwante metaboliete in haar uriene en serum.

In hierdie hoofstuk word 'n uiteensetting gegee van die verskillende komponente van die melanien biosintesesisteem: die selle en organelle waarin en die metaboliese weë waarlangs melanien gesintetiseer word asook die metaboliete afkomstig van hierdie weë, word bespreek. Verskillende vorme van hipopigmentering word kortliks bespreek aangesien die pasiënt wat ondersoek is moontlik een van hierdie vorme van hipopigmentering kon hê.

2.2 MELANIEN EN DIE FUNKSIES DAARVAN

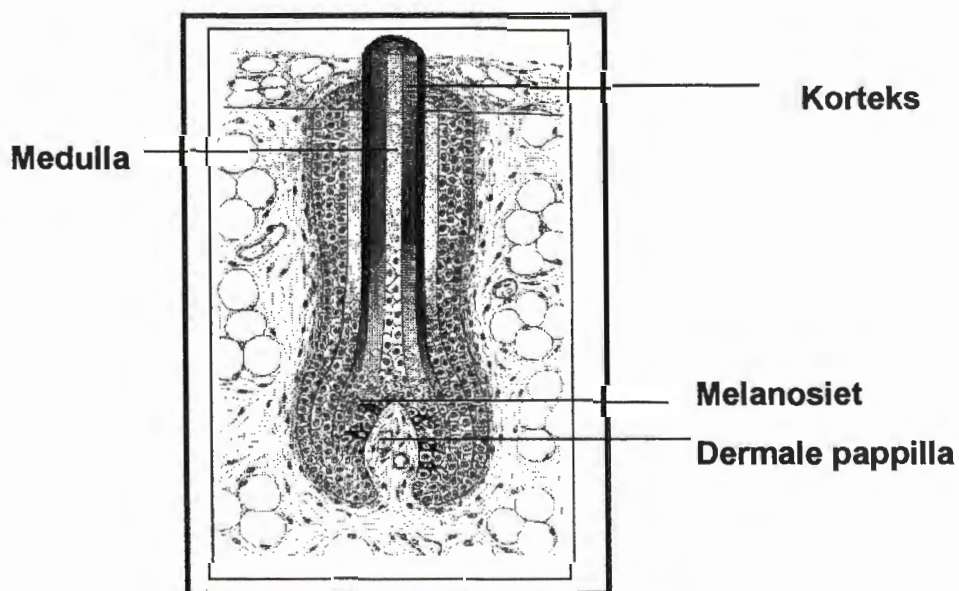
Melaniene is komplekse, heterogene, polimeriese pigmente wat wyd verspreid voorkom in die natuur (Seraglia *et al.*, 1993). Die hoof biologiese funksie van melanien is om die liggaam te beskerm teen verskillende tipes ioniserende straling, onder andere ultra-violet lig (Hansson, 1988; Aroca *et al.*, 1992). Heelwat onbeantwoorde vrae omtrent die samestelling van hierdie biologiese pigmente bestaan steeds aangesien hierdie polimere sekere eienskappe vertoon, byvoorbeeld onoplosbaarheid in waterige oplossings en die gebrek aan duidelike fisiese en spektroskopiese kenmerke wat strukturele analyses bemoeilik (Napolitano *et al.*, 1996b).

Melaniene wat algemeen in die diereryk voorkom kan in drie hoofklasse ingedeel word (Martin *et al.*, 1985; Prota, 1988), naamlik.:

- (a) Eumelanien wat voorkom in vel, hare, voëlvere, kankeragtige melanoma, die inksak van die seekat, die substantia nigra van primate, ensovoorts (Seraglia *et al.*, 1993). Tirosien is die voorganger van eumelanien (Martin *et al.*, 1985). Eumelanien is 'n donkerbruin tot swart hoë molekulêre gewig materiaal wat onoplosbaar is in suuragtige of alkaliese medium (Ito, 1993).
- (b) Feomelaniene wat verantwoordelik is vir die kleur van menslike rooi hare, rooi hoendervere en die rooi pels van die jakkals en ander diere (Seraglia *et al.*, 1993). Tirosien en sisteïen is die voorgangers van feomelanien (Martin *et al.*, 1985). Feomelanien is 'n geel tot rooi-bruin, hoë molekulêre gewig materiaal, wat oplosbaar is in alkali (Ito, 1993).
- (c) Trichochrome wat lae molekulêre gewig feomelanienagtige pigmente is met 'n goed gedefiniëerde struktuur. Hierdie lae molekulêre gewig pigmente is reeds geïsoleer uit rooi hoendervere en wortelrooi menslike hare (Prota, 1988).

2.3 DIE MELANOSIETE

In die menslike liggaam vind die biosintese van eumelanien en feomelanien plaas in gespesialiseerde dendritiese selle, genaamd melanosiete (Prota, 1988). By die mens kom melanosiete voor in die vel, die mukusmembrane, sekere dele van die senuweestelsel, oë en die binne-oor (Witkop *et al.*, 1989). Die melanosiete in die vel kom veral op drie anatomiese posisies voor, naamlik: die haarwortels, die basismembraan waar die epidermis in die vel aansluit by die dermis en ook in die dermis van die vel (Fawcett *et al.*, 1994). Gedurende die fase van aktiewe groei van die haarwortel kom die melanosiete van die haarwortels voor in die boonste gedeelte van die haarwortelbulbus (Figuur 2.1) in die nabyheid van die dermale papilla (Sugiyama & Kukita, 1975; Boissy, 1988).



Figuur 2.1: Lengtesnit deur 'n haarwortel (Fawcett *et al.*, 1994).

Die melanosiete wat voorkom op die basismembraan by die dermo-epidermale aansluiting en die melanosiete van die haarwortel is in aanraking met ander selteipes, onder andere die keratinosiete in die epidermis en die selle van die korteks en matriks in die haar (Ortonne *et al.*, 1983; King *et al.*, 1995). Die matriks- en korteksselle van die hare is soortgelyk aan die keratinosiete van die epidermis, maar produseer 'n harder keratien as die keratinosiete van die epidermis (Fawcett *et al.*, 1994). Die dendriete van die melanosiete reik intersellulêr uit tussen hierdie keratinosiete (Witkop, 1983). Vorme van intersellulêre kontak met keratinosiete en ander selteipes deur byvoorbeeld desmosome kom nie voor by melanosiete nie (Ortonne *et al.*, 1983; Boissy, 1988). Die keratinosiete word egter wel aan mekaar geheg deur desmosome (Zelickson, 1967; Breatnach, 1975).

Keratinosiete bevat in hul sitoplasma bondels saamgegroepeerde keratienfilamente (Fawcett *et al.*, 1994), maar melanosiete bevat baie min filamente in hul sitoplasma (Zelickson, 1967). Die groot hoeveelhede keratienfilamente in die sitoplasma van keratinosiete veroorsaak dat hul sitoplasma meer dig en donkerder vertoon in elektronmikrograwe as die sitoplasma van melanosiete (Ham & Cormack, 1979). Ultrastruktureel is die melanosiet sitoplasma redelik helder en deursigtig en bevat heelwat mitochondria met 'n paar elektrondigte partikels wat verspreid in die sitoplasma voorkom (Zelickson, 1967). Hierdie elektrondigte partikels is gespesialiseerde organelle, die melanosome, waarin melanienbiosintese plaasvind (Szabó *et al.*, 1972). Melanosiete besit ronde kerne met dubbele kernmembrane en hul dendriete, waarin heelwat melanosome voorkom, kan ultrastruktureel tussen omringende keratinosiete waargeneem word (Zelickson, 1967; Weiss, 1983).

2.4 MELANOSOME

2.4.1 Die voorkoms en grootte van melanosome

Twee tipes melanosome word in melanosiete geproduseer, naamlik: ellipsvormige (rond in dwarssnit) eumelanosome en sferiese feomelanosome (Inazu & Mishima,

1993). Eumelanosome kom kenmerkend voor in die melanosiete van byvoorbeeld bruin en swart hare waarin hoofsaaklik eumelanogenese plaasvind (Witkop *et al.*, 1983). Melanien word op 'n geordende wyse in eumelanosome neergelê en melanien is eweredig verspreid in hierdie melanosome (Witkop *et al.*, 1989). Feomelanosome kom veral voor in strukture wat hoofsaaklik feomelaniene produseer, byvoorbeeld die haarfollikels van sommige persone met rooi hare (Pavel, 1993). Feomelanosome vertoon 'n oneweredige verspreiding van melanien op 'n gevlekte wyse (Jimbow *et al.*, 1983; Witkop *et al.*, 1989).

Eumelanosome besit 'n interne matriks van melanofilamente wat in 'n geordende heksagonale patroon gerangskik is maar in feomelanosome kom hierdie filamente baie ongeorganiseerd voor (Jimbow *et al.*, 1979). Die normale maksimum grootte van menslike haarwortelmelanosome lê in die gebied van 0.7-0.9 x 0.15-0.3 μm vir eumelanosome en 'n deursnee van ongeveer 0.7 μm vir feomelanosome (Witkop, 1971; Boissy, 1988). Die groottes van melanosome kan egter heelwat varieer afhangende van die haarkleur en ras van 'n individu (Frenk, 1979; Boissy, 1988). So byvoorbeeld het melanosome in die vel van lig-gepigmenteerde Europeërs 'n lengte van 0.6-0.7 μm , maar die melanosome in die vel van Negers het 'n lengte van 0.7-1.3 μm (Frenk, 1979).

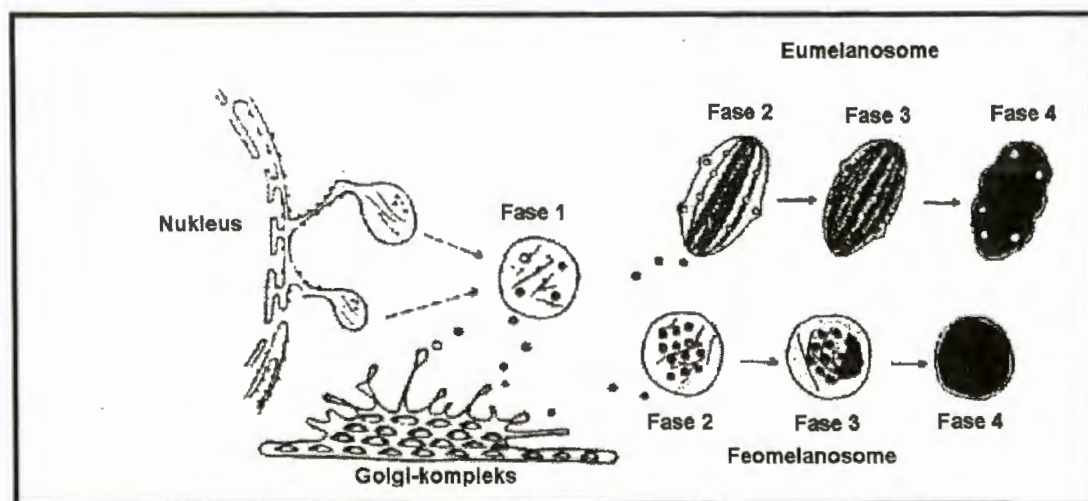
2.4.2 Die vorming en melanisering van die melanosome

Die filamentagtige, strukturele matriksproteïene van die melanosome word gesintetiseer op die growwe endoplasmiese retikulum, en word verpak in membrane in die growwe of gladde endoplasmiese retikulum van melanosiete om 'n organel, die premelanosoom, te vorm (Witkop *et al.*, 1989).

Tirosinase, die ensiem wat die eerste twee reaksies in die melanien biosintese-weg kataliseer, word gesintetiseer deur ribosome gebonde aan die growwe endoplasmiese retikulum (Boissy, 1988). Tirosinase word deur die growwe endoplasmiese retikulum vervoer na die golgi-apparaat waar dit geglikosileer en

omhul word deur mikrovesikels (Witkop *et al.*, 1989). Tirosinase word binne-in hierdie vesikels oorgedra na premelanosome in die sitoplasma van die sel (Hearing, 1993).

Sodra hierdie vesikels, wat tirosinase bevat, verenig met die premelanosome begin melaniensintese binne-in die premelanosoom (King *et al.*, 1995). Gedurende die melaniseringsproses word melanien stelselmatig meer en meer neergelê op die melanofilamente in die melanosoom (Boissy, 1988). Gedurende hierdie proses van toenemende melanien neerlegging beweeg die melanosoom dus deur verskeie fases van ontwikkeling (Jimbow *et al.*, 1979). Figuur 2.2 toon die ultrastrukturele voorkoms van die verskillende fases van melanosoomontwikkeling (Jimbow *et al.*, 1979).



Figuur 2.2: Die ontwikkelingsfases van eu- en feomelanosome.

Gedurende die vroeë fases van ontwikkeling is vesikuloglobulêre liggaampies, membraanringde vesikels met 'n deursnit van 40 nm, sigbaar in die melanosome (Jimbow *et al.*, 1979). Die presiese aard van hierdie liggaampies is onbekend, maar dit is al voorgestel dat hulle afkomstig is vanaf die tirosinase-bevattende vesikels, wat oorgedra word vanaf die golgi-kompleks en met die premelanosome saamsmelt (Boissy, 1988). Gedurende hierdie melaniseringsproses beweeg die melanosome

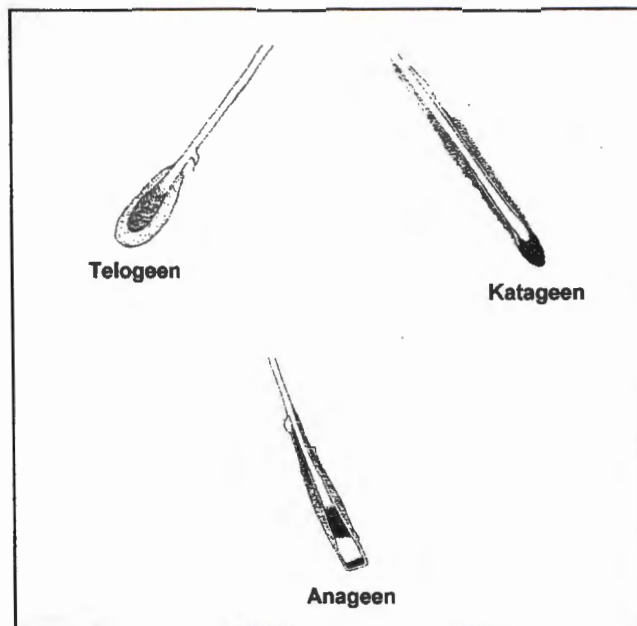
deur die sitoplasma na die dendritiese eindpunte van die melanosiet (Ortonne *et al.*, 1983).

2.4.3 Melanosomale oordrag na en voorkoms in die keratinosiete

By die dendritiese eindpunte van melanosiete word melanosome oorgedra na die keratinosiete (Yamamoto & Bhawan, 1994). In die geval van haarwortel melanosiete blyk dit dat gedeeltes van die dendritiese prosesse van melanosiete gefagositeer word deur keratinosiete (Boissy, 1988). Hierdie gefagositeerde melanosome kom vir 'n kort tydjie in membraangebode komplekse voor of as aggregate van twee of meer melanosome binne membraangebode organelle (Boissy, 1988). Dit kom voor asof geaggregeerde melanosome in keratinosiete geleidelike degradasie na klein elektrondigte partikels ondergaan (Witkop *et al.*, 1989). Die aggregering van melanosome blyk 'n grootte-afhanklike verskynsel te wees, aangesien kleiner ellipsvormige melanosome geaggregeerd voorkom in keratinosiete in die vorm van sekondêre lisosome, waarin melanosome afgebreek word (Ortonne *et al.*, 1983). Groter melanosome kom gewoonlik as enkel, ongeaggregeerde organelle in keratinosiete voor (Boissy, 1988; Witkop *et al.*, 1989). In die vel van blanke persone is melanosome gewoonlik verspreid in keratinosiete as membraangebode komplekse wat ongeveer ses pigmentgranules en klein partikels bevat (Ortonne *et al.*, 1983). In die vel van Negers kom groot ongeaggregeerde melanosome voor in keratinosiete (Szabo *et al.*, 1972).

2.5 MELANIENBIOSINTESE IN DIE VEL, OË EN HARE

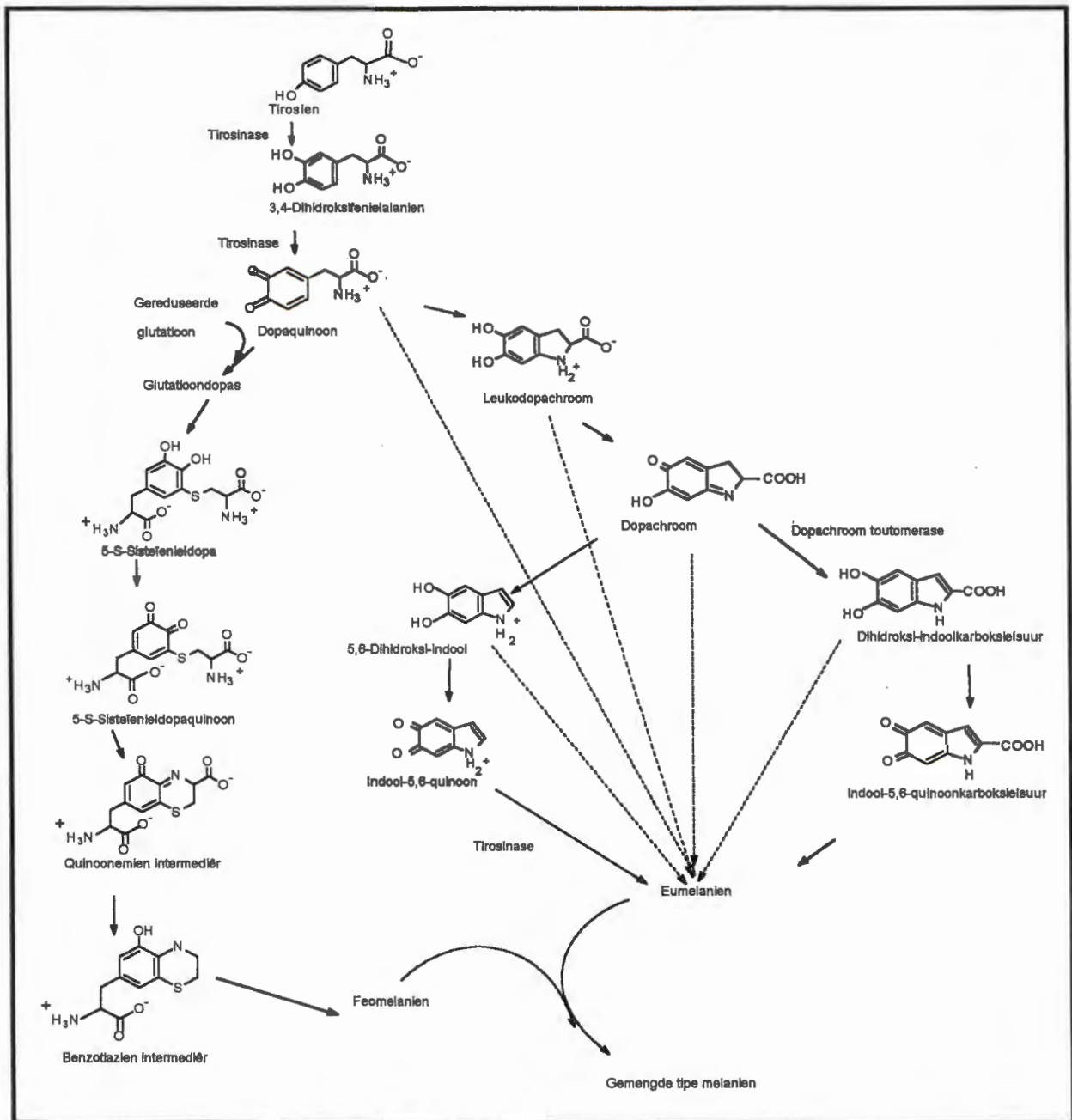
Haarwortel melanosiete produseer pigment op 'n sikliese wyse, gedurende elke fase van aktiewe haargroei (Kinnear *et al.*, 1985). Haargroei is 'n sikliese proses wat uit drie fases bestaan (Lavker *et al.*, 1991): (1) Die anageen fase van aktiewe haargroei, (2) die katageen fase of fase waarin groei getermineer word en die (3) telogeen fase of rustende fase. Haarwortel melanosiete sintetiseer melanien slegs gedurende die anageen fase van groei (Van Scott *et al.*, 1957; Boissy, 1988).



Figuur 2.3: Die voorkoms van die haarwortel gedurende die hoof groeifases van die haar (Van Scott *et al.*, 1957; Lavker *et al.*, 1991).

Melanienbiosintese in die melanosiete van die oë is voor geboorte of kort na geboorte voltooid en geen verdere melanisering van melanosome vind plaas vir die res van 'n persoon se lewe nie (Boissy, 1988). Melanosome bly binne hierdie melanosiete en word nie oorgedra na ander selle nie (Boissy, 1988). Melanosiete van die epidermis sintetiseer voortdurend lewenslank melanosome wat oorgedra word na keratinosiete (Boissy, 1988).

2.6 DIE MELANIEN BIOSINTESEWEG



Figuur 2.4: Die melanien biosinteseweg (Martin *et al.*, 1985).

Die metaboliese weg waarvolgens eumelanien en feomelanien in die melanosome gesintetiseer word, is in figuur 2.4 weergegee. Die beginsubstraat van die melanien biosinteseweg is die aminosuur L-tirosien (Martin *et al.*, 1985). Hierdie substraat

word deur middel van die L(leusien)-sisteem oor die melanosiet selmembraan vanuit die ekstrasellulêre vloeistof tot in die melanosiet vervoer (Pavel, 1993). Hierdie vervoersisteem is 'n uitruil-vervoersisteem tussen ekstra en intrasellulêre aminosure wat lang vertakte of aromatiesse sykettings besit (Pavel, 1993).

2.6.1 Eumelanogenese

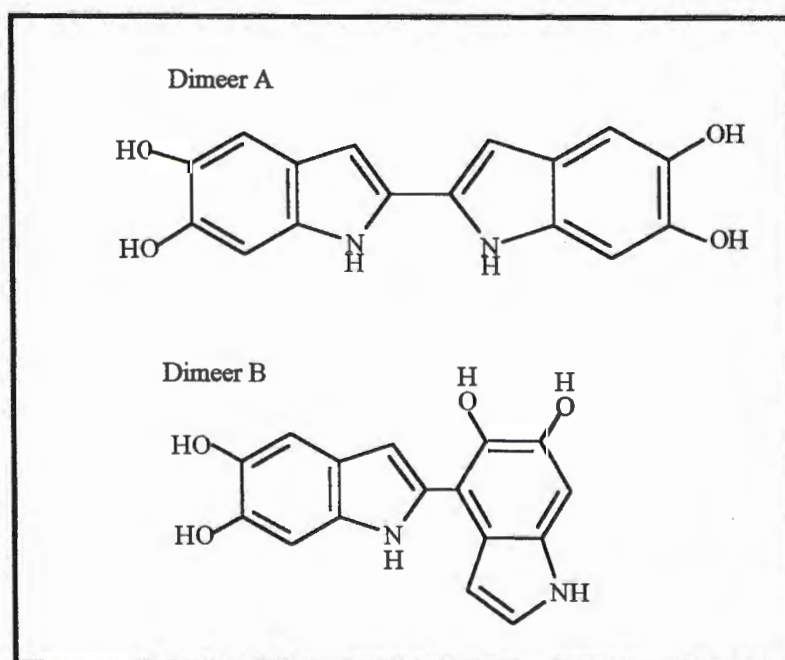
Soos blyk uit figuur 2.4 is die eerste stap in hierdie metaboliese weg die ensiem-gekataliseerde hidroksilering van L-tirosien na L-DOPA (Martin *et al.*, 1985). Hierdie reaksie is die snelheidsbepalende stap in die melaniën biosintese-weg (King *et al.*, 1995). L-DOPA is 'n ko-faktor vir hierdie reaksie (Körner & Pawelek, 1982). Dit is 'n uiters belangrike stap aangesien die oorblywende reaksies in die weg spontaan by fisiologiese pH kan plaasvind (Hearing & Tsukamoto, 1991). Die volgende reaksie in die weg, naamlik die oksidering van L-DOPA na dopaquinon, word ook gekataliseer deur die ensiem tirosinase (Hansson, 1988). L-DOPA kan egter ook outo-oksideer na dopaquinon in die afwesigheid van tirosinase, maar teen 'n stadiger tempo as in die teenwoordigheid van die ensiem (King *et al.*, 1995). Die hoogs reaktiewe dopaquinon ondergaan spontane intramolekulêre siklisering na leukodopachroom wat vinnig geoksideer word na dopachroom deur 'n redoksuitruilreaksie met dopaquinon (Prota, 1988).

Onder fisiologiese kondisies ondergaan dopachroom 'n herrangskikkingsreaksie wat gepaard gaan met dekarboksilering om dihidroksi-indool (DHI) te vorm (Napolitano *et al.*, 1996b). DHI word geoksideer na indool-5,6-quinon wat oksidatiewe polimerisering ondergaan om eers oligomeriese intermediêre, onder andere melanochroom, te vorm wat nog verder polimeriseer na eumelaniën (Pawelek, 1991; Napolitano *et al.*, 1996b). Die omsetting van DHI na indoolquinon word ook deur tirosinase gekataliseer (Körner & Pawelek, 1982). Dopachroom kan in die afwesigheid van 'n katalisator spontaan maar teen 'n stadige tempo omvorm na DHI (Pawelek, 1991). *In vivo* word die omsetting van dopachroom na dihidroksi-indoolkarboksiesuur (DHIK) bevoordeel bo die vorming van DHI deur die werking

van dopachroom toutomerase (Leonard *et al.*, 1985). Die gevormde DHIK kan ook verder oksideer na melanien om sodoende melanien met 'n hoë karboksielsuurinhoud te lewer (Palumbo *et al.*, 1987; Pezzella *et al.*, 1996). Die werking van dopachroom toutomerase is dus verantwoordelik vir die hoë karboksielsuurinhoud van natuurlike melanien (Pawelek, 1991). Sekere metaalione, byvoorbeeld dié van sink, koper, kobalt en nikkell veroorsaak *in vitro* dat dopachroom omvorm na DHIK eerder as DHI (Prota, 1993). Baie hoë vlakke van hierdie metaalione kom voor in verskeie gepigmenteerde weefsels (Prota, 1988). Metaalione speel dus moontlik ook 'n rol in die herrangskikking van dopachroom *in vivo*.

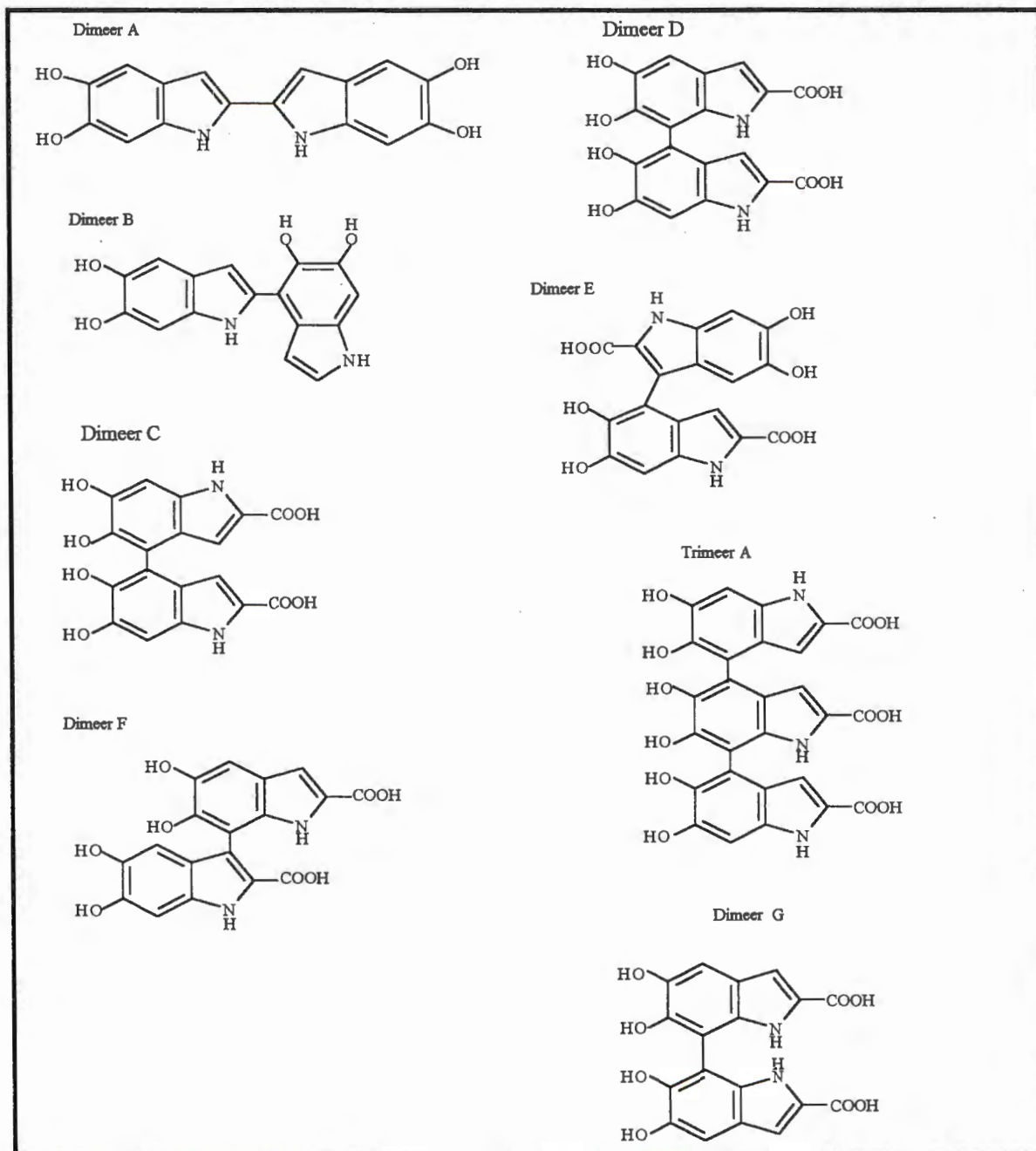
2.6.2 Die polimerisering na en struktuur van eumelanien

Prota (1988) het aangetoon dat veral dimeer A (figuur 2.5) gevorm word wanneer DHI lugoksidase in teenwoordigheid van metaalione ondergaan. Wanneer DHI deur tirosinase geoksideer word, word dimeer B (figuur 2.5) eerder as dimeer A gevorm.



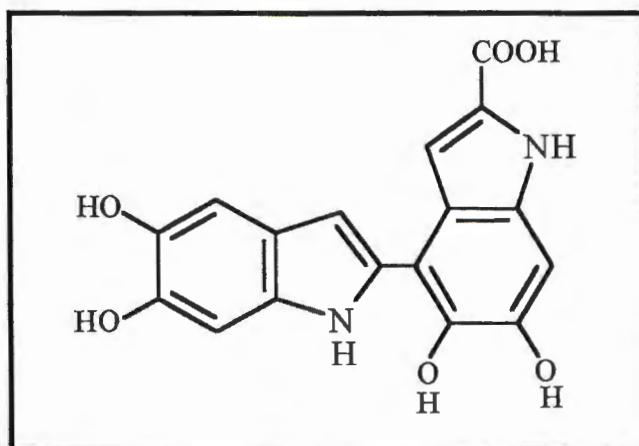
Figuur 2.5: Dimere wat vorm tydens die oksidasie van DHI.

Wanneer die polimerisering van DHIK deur metaalione gekataliseer word, word veral dimeer C (figuur 2.6) gevorm (Prota, 1988). Wanneer DHIK deur tirosinase geoksideer word in die teenwoordigheid van L-DOPA, vorm dimeer C en D en trimeer A (Palumbo *et al.*, 1987) asook kleiner hoeveelhede van dimeer E, F en G (Pezzella *et al.*, 1996).



Figuur 2.6: Oligomere wat vorm tydens die oksidasie van DHIK.

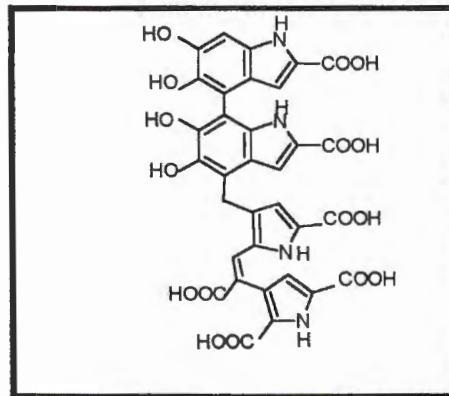
Napolitano *et al.* (1993) het aangetoon dat DHI en DHIK kan ko-polimeriseer tydens oksidasie deur peroksidase in die teenwoordigheid van waterstofperoksied om 'n kruiskoppelingsproduk (Figuur 2.7) te vorm. Moontlik vind hierdie kruiskoppeling ook *in vivo* plaas.



Figuur 2.7: Die kruiskoppelingsproduk van DHI en DHIK.

Eumelanien is hoofsaaklik 'n ko-polimeer van DHI en DHIK, maar verskeie ander eumelanien intermediêre neem tot 'n mate deel aan polimerisering na eumelanien (Witkop *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1990; King *et al.*, 1995).

Napolitano *et al.* (1996b,c) het aangetoon dat eenhede in die polimeriese ketting van DHI- en DHIK-melanien peroksidatiewe degradasie ondergaan gedurende polimerisasie na eumelanien. As gevolg hiervan is die eumelanien polimeer opgebou uit indoliese eenhede, DHI en DHIK, maar ook uit hul peroksidatiewe degradasieprodukte, soos gesien kan word in figuur 2.8. Hierdie peroksidatiewe degradasie word waarskynlik teweeg gebring deur waterstofperoksied wat geleidelik vorm tydens tirosinase oksidasie van DHI en DHIK (Napolitano *et al.*, 1996b).



Figuur 2.8: Gedeeltelik gedegradeerde oligomere wat vorm tydens die polimerisering na eumelanien.

2.6.3 Feomelanogenese

Die biosintese van feomelanien volg basies dieselfde weg as eumelanogenese tot en met die vorming van dopaquinoon (Martin *et al.*, 1985). Indien sulfhidriëlgroepe, veral sisteïen of glutatïon, teenwoordig is, sal dopaquinoon met hierdie groepe reageer om sisteïeniëldopa derivate te vorm (King *et al.*, 1995).

Verskeie sisteïeniëldopas word gevorm deur die binding van sisteïen aan dopaquinoon. Sisteïeniëldopa is die monomere waaruit die feomelanien polimeer saamgestel is (Hansson, 1988) en 5SSD is die isomeer wat in die grootste hoeveelheid gevorm word (Witkop *et al.*, 1989). 2-S-Sisteïeniëldopa word in 20% van die 5SSD hoeveelheid gevorm maar 6-S-sisteïeniëldopa word slegs in spoorhoeveelhede gevorm (Witkop *et al.*, 1989). Hierdie sisteïeniëldopas word omgesit na hul ooreenstemmende bensotiasiene deur oksidatiewe siklisering van die sisteïeniëresidue (Thompson *et al.*, 1985; Prota, 1993; Napolitano *et al.*, 1994). Die bensotiasien intermediêre polimeriseer dan na feomelanien (Witkop *et al.*, 1989; Prota, 1993).

2.6.4 Wyse van polimerisering na en die struktuur van feomelanien

Daar bestaan nog groot onsekerheid oor die presiese wyse waarop bensotiasien intermediêre polimeriseer na feomelanien. Constantini *et al.* (1990) kon egter wel daarin slaag om twee oligomeriese produkte van die tirosinase oksidasie van 5SSD te identifiseer. Hierdie 2 verbindings is diastereomere van struktuur A (fig.2.9). Napolitano *et al.* (1996a) het ook aangetoon dat die peroksidase/waterstofperoksied gekataliseerde oksidasie van 5SSD oligomere B en C (fig.2.9) lewer.

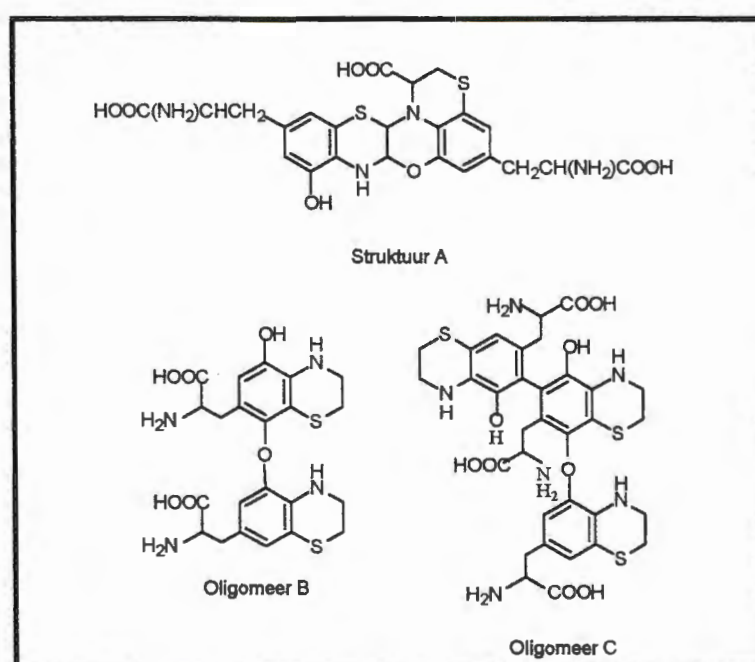


Figure 2.9: Oligomere wat vorm tydens die oksidasie van 5SSD na feomelanien.

2.6.5 Faktore wat 'n rol speel in die regulering van die melanien biosintese

Die oksidering van DHI na indoolquinoon en die hidrosilering van tirosien na L-DOPA benodig L-DOPA as 'n ko-faktor (Körner & Pawelek, 1982). Tirosien inhibeer die omsetting van DHI na melanien en DHI inhibeer die oksidasie van tirosien na L-DOPA (Körner & Pawelek, 1982). Die relatiewe konsentrasies van tirosien en DHI in

die melanosiet is dus in staat om melanogenese te reguleer (Körner & Pawelek, 1982).

Daar bestaan ook 'n indool-blokkeringsfaktor, genaamd stablien, wat die spontane omsetting van DHI en DHIK na melanien vir relatief lang periodes vertraag (Witkop *et al.*, 1989; Pawelek, 1991). Baie peptiede en polipeptiede wat blootgestelde tirosien of fenielalanien residue besit, kan ook optree as kompeterende inhibeerders van tirosinase (King *et al.*, 1995). Hierdie melanogenese inhibeerders speel moontlik 'n rol by hipopigmenteringskondisies waar normale vlakke van tirosinase aktiwiteit in melanosiete voorkom. Regulerende faktore wat optree in die verdere metabolisme van sisteïniel dopas en hul derivate kon tot dusver nog nie geïdentifiseer word nie (King *et al.*, 1995).

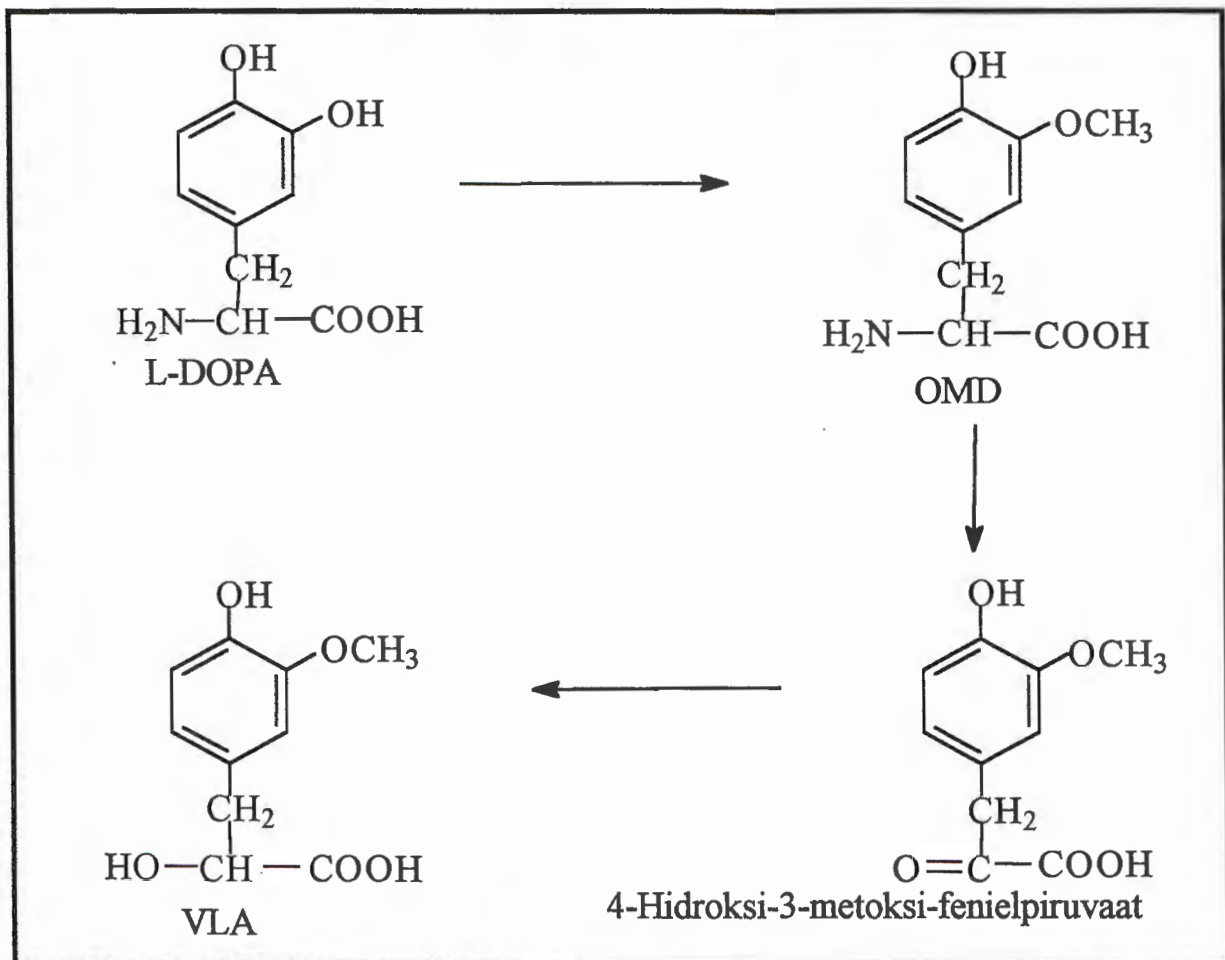
2.7 MELANIENVERWANTE METABOLIE TE

2.7.1 Inleiding

Nie al die voorlopers van melanien wat tydens melanogenese in die melanosiete geproduseer word, word aangewend in die polimeriseringsproses na melanien nie (Pavel, 1993). 'n Gedeelte daarvan beweeg uit die melanogeniese kompartemente in die melanosiete, beweeg uit die melanosiete, word vervoer in die bloedstroom en uitgeskei in die uriene (Pavel, 1993; Horikoshi *et al.*, 1994). Een groep van hierdie metaboliete is dié van indoliese aard afkomstig van eumelanogenese, byvoorbeeld DHI en DHIK (Prota, 1993). Ook sommige fenoliese verbindings, byvoorbeeld L-DOPA, en hul metaboliete in die bloedstroom en uriene is deels afkomstig van melanienbiosintese in die melanosiete (Westerhof *et al.*, 1987). Die hoof metaboliet van feomelanogenese wat in uriene en serum aangetref word is 5SSD (Prota, 1988).

Die ensiem katesjol-O-metieltransferase (KOMT) kom in membraangebonde vorm in die endoplasmiese retikulum voor en in oplosbare vorm in die melanosiete (Smit *et*

al., 1994). Hierdie ensiem is verantwoordelik vir die O-metielering van die dihidroksi-indoliese intermediêre van melanogenese (Pavel, 1993) om sodoende die O-metielderivate 5-hidroksi-6-metoksi-indool (5H6MI), 6-hidroksi-5-metoksi-indool (6H5MI), 5-hidroksi-6-metoksi-indool-2-karboksielsuur (5H6MI2K), 6H5MI2K en 5,6-dimetoksi-indool-2-karboksielsuur (5,6DMI2K) (Pavel *et al.*, 1986) te lewer. L-DOPA kan ook in die melanosiet gemetieleer word na 3-metoksitirosien (Smit *et al.*, 1994). Die ensiem KOMT kom egter wyd verspreid deur die liggaam voor (Hansson, 1984; Martin *et al.*, 1985; Prota, 1988) en O-metielering kan dus ook in ander weefsels, byvoorbeeld lewerweefsel, plaasvind. 3-Metoksi-tirosien word verder gemetaboliseer volgens die reaksies getoon in figuur 2.10 (Bartholini *et al.*, 1972; Jouve *et al.*, 1992; Hyland *et al.*, 1996).



Figuur 2.10 : Die metabolisme van OMD.

Die isomeriese glukuronied en sulfaatkonjugate van 5H6MI en 6H5MI en die 6-O-sulfaat van DHI word in die uriene uitgeskei, nadat dit in die lewer gevorm is deur die konjugering van die O-metielderivate van DHI met glukuronsuur en swaelsuur (Hara *et al.*, 1994). 5H6MI2K en 6H5MI2K, die O-metielderivate van DHIK, en DHIK self word eerder in vrye ongekonjugeerde vorm in uriene uitgeskei (Hansson, 1988; Yamada *et al.*, 1992).

2.7.2 Melanienverwante metaboliete as merkers van melanosiet aktiwiteit

Die vlakke van melanienverwante metaboliete in die uriene en serum van 'n persoon gee 'n aanduiding van melanosiet aktiwiteit in die liggaam van 'n persoon (Hansson, 1988). So byvoorbeeld kom sekere melanienverwante metaboliete in verhoogde vlakke voor in die uriene en serum van pasiënte met metastatiese melanoma (Ito & Wakamatsu, 1989; Yamada *et al.*, 1992). Melanoma is kanker van die melanosiete (Jimbow *et al.*, 1993). Melanogenese vind tot 'n verhoogde mate plaas in melanoma gewasse (Boivin *et al.*, 1993) en die aktiwiteit van tirosinase is verhoog in melanomaselle (Duchon *et al.*, 1977; Prota, 1988).

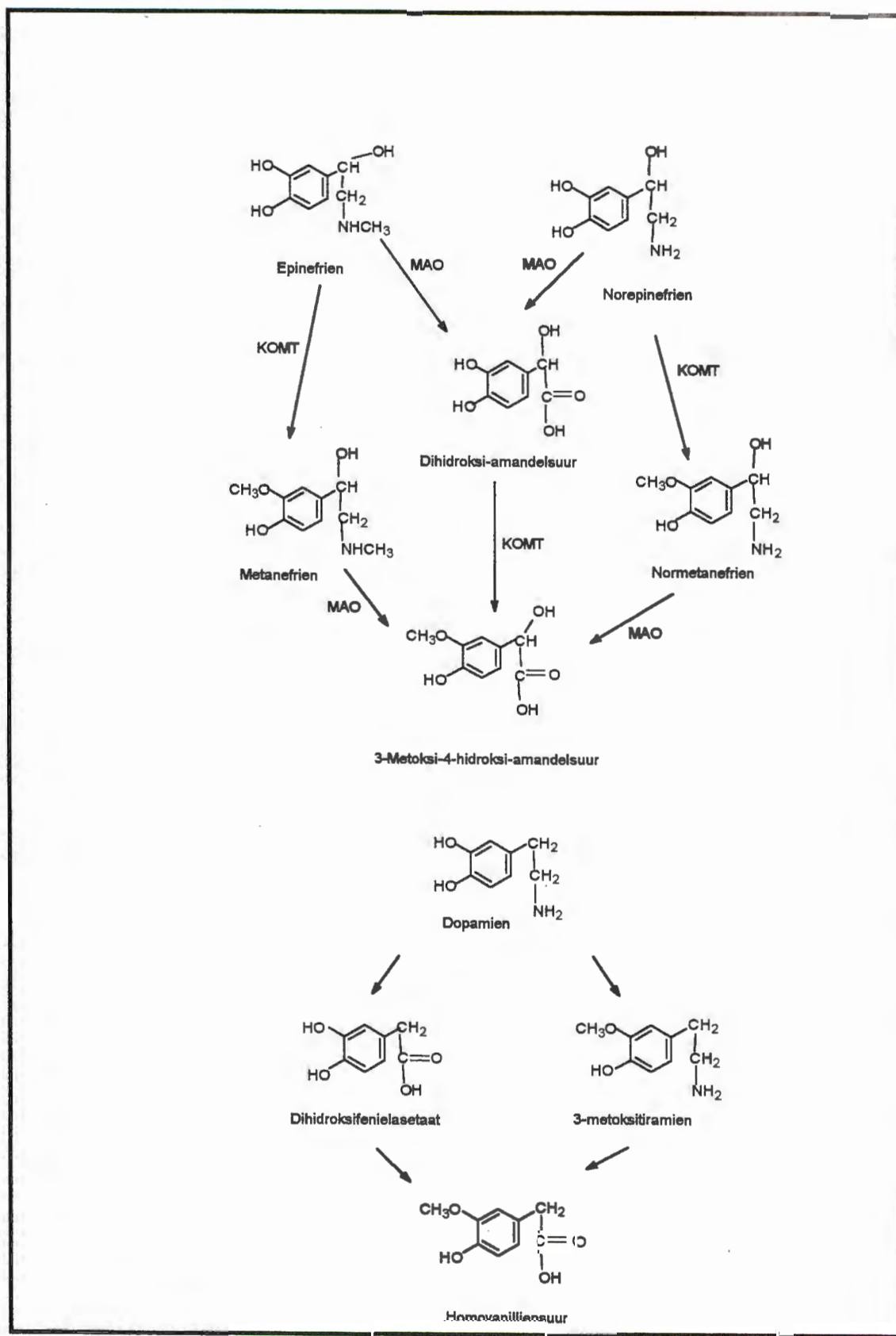
Die groep indoliese en fenoliese verbindings wat in verhoogde vlakke voorkom in die uriene van melanoma pasiënte word melanogene genoem (Prota, 1988). Een van die melanogene is L-DOPA (Hara *et al.*, 1994) maar word egter nie slegs in melanosiete geproduseer nie. In ander weefsels kan ensieme, wat in staat is om tirosien te hidroksileer, ook L-DOPA sintetiseer (Westerhof *et al.*, 1987). Een so 'n ensiem is tirosienhidroksilase. Hierdie ensiem kom slegs voor in weefsel waar katesjolamiensintese plaasvind, byvoorbeeld sekere breinweefsels en die adenale medulla (Martin *et al.*, 1985). In hierdie weefsel word die gevormde L-DOPA aangewend om die katesjolamiene DA, epinefrien en norepinefrien te sintetiseer (Martin *et al.*, 1985). L-DOPA word tot 'n groot mate gedekarboksileer na DA deur die aromatiese L-aminosuur dekarboksilase ensiem, wat in alle weefsels in die liggaam voorkom (Granner, 1985). Om hierdie rede word eerder die vlakke van L-

DOPA metaboliete in die uriene en serum van pasiënte bepaal, aangesien dit 'n aanduiding gee van L-DOPA omsetting (Hara *et al.*, 1994; Jimbow *et al.*, 1993).

Die hoof metaboliese produkte van L-DOPA wat in die uriene uitgeskei word is HVA, DOPAC, DA en 3-metoksitirosien. Die hoof metaboliese produkte van DA wat in die uriene uitgeskei word is HVA en VMA (Sharman, 1973; Jimbow *et al.*, 1993). Die gevormde DA, epinefrien en norepinefrien word verder gemetaboliseer in die liggaam volgens die kataboliese weë in figuur 2.11.

Ook die feomelanien voorloper, 5SSD, kom in verhoogde vlakke in die uriene van melanoma pasiënte voor (Jimbow *et al.*, 1993). Veral 5SSD, 6H5MI2K en 5H6MI2K word in die uriene en serum van pasiënte gekwantifiseer om 'n diagnose van metastatiese melanoma te maak (Yamada *et al.*, 1992; Hara *et al.*, 1994; Horikoshi *et al.*, 1994).

6H5MI2K en 5H6MI2K is beter merkers van verhoogde melanosiet aktiwiteit as 5SSD (Westerhof *et al.*, 1987; Hansson, 1988). So byvoorbeeld kan geen 6H5MI2K waargeneem word in die uriene van persone en diere met tirosinase negatiewe albinisme nie (Ekelund *et al.*, 1985; Hansson, 1988). 5SSD word wel waargeneem in die uriene van persone met tirosinase negatiewe albinisme, maar in vlakke laer as by normale persone (Hansson, 1988). By persone en diere met tirosinase negatiewe albinisme kom geen tirosinase aktiwiteit in die melanosiete voor nie (Kinnear *et al.*, 1985). By persone en diere met tirosinase positiewe albinisme kom daar wel tirosinase aktiwiteit voor in die melanosiete (Hittner *et al.*, 1982; Kinnear *et al.*, 1985). In die uriene van persone en diere met hierdie vorm van albinisme kom 6H5MI2K voor in konsentrasies in die laer normale konsentrasie-gebied (Hansson, 1988), maar 5SSD kom in normale vlakke voor (Nimmo *et al.*, 1985; Saito & Morishima, 1991). 5SSD kan dus in die liggaam gevorm word deur tirosinase onafhanklike meganismes en sommige 5SSD kan selfs buite die melanosiete gevorm word (Wirestrand *et al.*, 1985).



Figuur 2.11: Die kataboliese weë van DA, epinefrien en norepinefrien (Martin *et al.*, 1985).

2.7.3 Melaniënverwante metaboliete en die verdonkering van liggaamsvloeistowwe

Die uriene van melanoma pasiënte met lewer metastase verdonker na 'n bruin tot swart kleur wanneer dit aan lug blootgestel word (Hansson, 1988). Hierdie verdonkering is die gevolg van verhoogde vlakke van melaniën voorgangers en metaboliete in die uriene van hierdie pasiënte (McClements *et al.*, 1988; Boivin *et al.*, 1993; Banda *et al.*, 1977). Hierdie verdonkering is dus die gevolg van die polimerisering van kleurlose melaniëvoorgangers na melaniën, aangesien die verbindings na L-DOPA in die melaniën biosintese-weg spontaan kan polimeriseer na melaniën (King *et al.*, 1995).

Dit is ook bekend dat die uriene en speeksel van pasiënte, wat behandel word met L-DOPA, soms verdonker (Altmann, 1980). Grainger (1973) beskryf ook 'n geval waar L-DOPA behandeling gelei het tot die herpigmentering van grys hare. L-DOPA en α -metiëldopa behandeling lei ook tot die swart pigmentasie van rib kraakbeen (Rausing & Rosén, 1994). Ook behandeling met L-DOPA derivate soos α -metiëldopa, lei soms daartoe dat die uriene van pasiënte spontaan swart word weens melaniënvorming (McClements *et al.*, 1988). Hierdie spontane vorming van melaniën vanaf melanogene in uriene vind egter slegs plaas by 'n urinêre pH van 7 of meer, aangesien melaniënvorming by suur pH uiters stadig plaasvind (Altmann, 1980). Stewart *et al.* (1983) het aangetoon dat L-DOPA behandeling ook kan lei tot verhoogde vlakke van 5SSD in pasiënte se uriene.

Dit is dus duidelik dat enige toestand of behandeling wat lei tot 'n verhoging in die vlakke van melaniënverwante metaboliete in die uriene en speeksel, kan veroorsaak dat hierdie liggaamsvloeistowwe verdonker weens spontane melaniënvorming.

2.8 HIPOPIGMENTERING

2.8.1 Inleiding

Verskillende vorms van hipopigmentering is reeds by die mens geïdentifiseer (Ortonne *et al.*, 1983). Sommige van hierdie vorme is die gevolg van spesifieke defekte in die melanien biosintesisisteem (Witkop, 1983). By ander vorme lê die primêre defek nie by melanienbiosintese nie, maar melanienbiosintese word wel sekondêr beïnvloed (King *et al.*, 1995).

By verskeie kondisies is die hipopigmentering beperk tot spesifieke areas van die liggame van pasiënte. Ortonne *et al.* (1983) gee 'n deeglike oorsig van hierdie kondisies waar algemene kutaneuse pigmentasie normaal is, maar gedepigmenteerde areas van 'n verskeidenheid groottes en vorme voorkom op die liggame van pasiënte. By 'n groot verskeidenheid kondisies kom aangebore, algemene hipopigmentering van die vel, hare en oë of slegs van die oë voor (Witkop, 1979; Kinnear *et al.*, 1985). Hierdie kondisies van algemene hipopigmentering kan verder onderverdeel word in twee hoofgroepe, naamlik albinisme en albinoidisme (Ortonne *et al.*, 1983; Witkop, 1983).

Okulokutaneuse albinisme verwys na kondisies waar aangebore hipopigmentering van die vel, hare en oë voorkom tesame met die volgende verskynsels in die optiese sisteem: nistagmus, verlaagde irispigmentasie, 'n verlaagde hoeveelheid retinale pigment met hipoplasia van die fovea, misgeleiding van die optiese vesels by die chiasma, verlaagde visuele vermoëns en fotofobie (Witkop, 1979; Witkop *et al.*, 1989). By die mens oorkruis 'n gedeelte van die senuweevesels afkomstig van elke retina van die oog na die visuele korteks in die teenoorgestelde helfte (lob) van die brein (Guyton, 1991). Die punt waar hierdie optiese vesels oorkruis, word die optiese chiasma genoem. By die mens oorkruis sommige van die optiese vesels nie maar gelei impulse na dieselfde kant van die brein as die oog van oorsprong om binokulêre visie moontlik te maak (Tortora & Anagnostakos, 1987). By albino

persone oorkruis die meeste van die vesels, wat in normale persone impulse gelei na dieselfde kant van die brein as die oog van oorsprong (Witkop, 1983). Hierdie defek kan elektro-fisiologies aangetoon word (Witkop *et al.*, 1983).

Albinoidisme verwys na kondisies van algemene hipopigmentering waar nistagmus, fotofobie en verlaagde visuele vermoë nie voorkom nie (Witkop, 1979; Kinnear *et al.*, 1985). By albinoidisme kom algemene hipopigmentering van die vel en hare of vel, hare en oë voor, maar gewoonlik kom slegs matige depigmentering van die oë voor (Kinnear *et al.*, 1985). Witkop (1979; 1983) bied 'n klassifikasie van albinoidistiese kondisies.

Daar is minstens 147 gene by 62 verskillende genetiese loki wat pelskleur by muis beïnvloed (Witkop, 1979). Die beheer van pigmentasie by die mens is moontlik ook baie kompleks (Witkop, 1979). King *et al.* (1995) asook Hearing & Tsukamoto (1991) gee 'n beskrywing van die gene wat tans bekend is as gene wat pigmentasie beïnvloed. Verskillende mutasies in hierdie gene en ander ongeïdentifiseerde gene kan lei tot die kliniese kenmerke van die verskillende vorme van hipopigmentering, onder andere okulokutaneuse albinisme (King *et al.*, 1995).

2.8.2 Die verskillende vorme van okulokutaneuse albinisme (OKA)

2.8.2(a) Mutasies van die c-lokus

Sommige vorme van okulokutaneuse albinisme is die gevolg van mutasies in die c-lokus, ook genoem albino lokus (Hearing & Tsukamoto, 1991; Hearing, 1993). Die geen wat kodeer vir die tirosinase ensiem kom in hierdie genetiese lokus voor (Hearing, 1993). Verskillende mutasies binne die tirosinase geen lei tot verskillende grade van tirosinase aktiwiteit wat weer lei tot verskillende grade van pigmentering by geaffekteerde persone (King & Olds, 1985; King *et al.*, 1995). Vier vorme van okulokutaneuse albinisme, naamlik tirosinase negatiewe, geel, minimale pigment en temperatuur-sensitiewe okulokutaneuse albinisme word veroorsaak deur mutasies

in die tirosinase geen, wat lei tot verskillende grade van tirosinase aktiwiteit (King *et al.*, 1986; Giebel *et al.*, 1991; King *et al.*, 1995).

Veral twee metodes kan aangewend word om vas te stel of daar tirosinase aktiwiteit voorkom in 'n persoon se pigmentselle. Die een toets behels die inkubasie van vars geplukte anageen haarwortels in 'n oplossing van L-tirosien of L-DOPA in fosfaatbuffer by pH 6.8 en 37°C vir 12 tot 24 uur. Na die inkubasie-tydperk word haarwortels deur middel van 'n dissekteermikroskoop ondersoek om vas te stel of die haarwortel verdonker het weens die vorming van swart pigment (Witkop, 1983). Die ander metode behels die inkubasie van anageen haarwortels in 'n oplossing van radio-aktief gemerkte L-tirosien. Die hoeveelheid radio-aktief gemerkte water wat vorm tydens die omsetting van tirosien na L-DOPA word bepaal (King & Witkop, 1976; King & Witkop, 1977; King & Olds, 1985).

In Tabel 2.1 word die kliniese kenmerke van vorme van OKA (Witkop, 1979; Kinnear *et al.*, 1985; King *et al.*, 1995) wat veroorsaak word deur mutasies binne die c-lokus uiteengesit .

Tabel 2.1: Die kenmerke van vorme van OKA veroorsaak deur mutasies binne die tirosinase geen

Karakteristiek	Tirosinase negatief	Geel	Minimale pigment	Temperatuur sensitief
Haarkleur	Wit gedurende hele leeftyd.	Wit by geboorte. Geel teen ses maande.	Wit by geboorte. Ontwikkel 'n metaalagtige wit kleur.	Wit by geboorte. Haarkleur verskil op verskillende liggaamsdele.
Velkleur	Pienk tot rooi.	Wit by geboorte. Verdonkering ontwikkel in sonblootgestelde vel.	Pienkwit. Geen verdonkering in sonblootgestelde vel nie.	Wit.
Vlekke op die vel	Afwesig.	Teenwoordig.	Afwesig.	Soms.
Oogkleur	Grys tot blou.	Blou as baba. Verdonker later.	Grys tot blou.	Grys tot blou.
Irispigmentasie	Geen pigment.	'n Mate van pigmentasie. Deurskynendheid van die iris.	'n Klein mate van pigmentasie. Deurskynendheid van die iris.	Erge deurskynendheid van die iris.
Rooi refleks	Teenwoordig.	Teenwoordig.	Teenwoordig.	Onbekend.
Retinale pigmentasie	Afwesig.	0 tot + in volwassenes.	Geen.	Geen.
Nistagmus.	Teenwoordig deur leeftyd.	Teenwoordig deur leeftyd.	Teenwoordig deur leeftyd.	Teenwoordig gedurende hele leeftyd.
Fotofobie	++++	+ tot ++	++++	Onbekend.
Visuele vermoëns	20/200 tot 20/400+	20/90 tot 20/400	20/160 tot 20/200	20/100
Serum tirosienvlakke	Normaal.	Normaal.	Onbekend.	Onbekend.
Melanosome in haarwortels	Slegs fase 1 tot 2 kom voor.	Fase 1 tot 3 feomelanosome.	Fase 1 tot 3 premelanosome.	Onbekend
Inkubasie van haarwortels in tirosien.	Geen pigmentasie van haarwortels vind plaas.	Geen tot twyfelagtige pigmentering.	Geen pigmentasie.	Onbekend.
Misgeleiding van optiese vesels	Teenwoordig.	Teenwoordig.	Teenwoordig.	Teenwoordig.

2.8.2 (b) Mutasies in die p-geen

Die genetiese defek by tirosinase positiewe okulokutaneuse albinisme kom voor in die p-geen (Durham-Pierre *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Mutasies in die p-lokus van die muis beïnvloed ontwikkeling en veroorsaak okulêre en kutaneuse hipopigmentering (King *et al.*, 1995). Daar word vermoed dat hierdie geen moontlik vir 'n tirosien vervoerproteïen kodeer (King *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1994). Die p-geen kom voor in die 15q11-q13 chromosomale gebied (Lee *et al.*, 1994). Twee sindrome, die Angelman en Prader-Willi sindroom, word ook geassosieer met mutasies binne hierdie chromosomale gebied (Magenis *et al.*, 1990; Mutirangura *et al.*, 1993). Dikwels kom hipopigmentering voor by persone met hierdie sindrome (Mutirangura *et al.*, 1993).

2.8.2 (c) Mutasies in die Lyst geen

Die Chediak-Higashi sindroom (CHS) is 'n menslike outosomaal resessiewe siektetoestand wat veroorsaak word deur mutasies in 'n enkele geen wat kodeer vir 'n proteïen genaamd die lisosomale vervoer reguleerder. Die produk van die Lyst geen is betrokke by die sortering van proteïene uit endosome na laat multi-vesikulêre endosome deur 'n meganisme waarby mikrotubules betrokke is (Faigle *et al.*, 1998).

2.8.2 (d) Vorme van OKA waarvoor die genetiese defek onbekend is

Die genetiese defek wat voorkom by bruin en rooibruin OKA kon nog nie vasgestel word nie (King *et al.*, 1985; Kinnear *et al.*, 1985; King *et al.*, 1995). Hermansky-Pudlak sindroom is 'n vorm van OKA wat moontlik veroorsaak word deur fakore buite die melanien biosintese, maar melanienbiosintese word wel sekondêr beïnvloed (Schinella *et al.*, 1985; Witkop *et al.*, 1989; Zhao *et al.*, 1994).

Tabel 2.2 bied 'n opsomming van die hoof kenmerke van die verskillende vorme van okulokutaneuse albinisme wat veroorsaak word deur mutasies in die p-geen, Lyst geen en vorme van OKA waarvoor die onderliggende biochemiese defek onbekend is (King *et al.*, 1995).

Tabel 2.2: Die hoof onderskeidende kenmerke van die verskillende vorme van OKA

Eienskap	Tirosinase positief	Prader-willi en Angelman sindroom	Bruin	Rooibruin	Hermansky-Pudlak sindroom	Chediak-Higashi sindroom
Haarkleur	Wit by geboorte. Verdonker met ouderdom na roomwit tot geelbruin.	Blond tot ligbruin.	Lig tot medium bruin.	Rooibruin.	Wit, rooi of bruin.	Blond tot donkerbruin met 'n staalgrys skynsel.
Gepig - menteerde vlekke op vel.	Kom soms in groot hoeveelhede voor.	Soms.	Afwesig.	Teenwoordig.	Heelwat.	Teenwoordig.
Oogkleur.	Blou tot geelbruin.	Blou tot bruin.	Blou of grys tot ligbruin.	Geelbruin tot rooibruin.	Blou tot bruin.	Blou tot donkerbruin.
Irispigmentasie.	Pigment kom voor. 'n Klein tot erge mate van deurskynendheid van die iris.	Normaal tot 'n klein mate van iris deurskynendheid.	Pigment kom in 'n koetswiel patroon voor. Matige tot erge iris deurskynendheid.	Normaal tot 'n klein mate van deurskynendheid.	Geen pigment tot 'n koetswiel patroon. Matige tot erge deurskynendheid.	Koetswielpatroon van pigment tot normaal.
Rooi refleks.	Teenwoordig. Afwesig by volwassenes van 'n donker ras.	Onbekend.	Teenwoordig by kinders. Soms afwesig by volwassenes.	Onbekend.	Teenwoordig by persone van ligte rasse.	Teenwoordig. Minder na vyfjarige ouderdom.
Retinale pigmentasie.	0 tot ++	+ tot ++++	++ tot +++	+++	0 tot +++	0 tot +++
Nistagmus	Kom voor gedurende die hele leeftyd.	Teenwoordig of afwesig.	Teenwoordig gedurende die hele leeftyd.	Teenwoordig of afwesig.	Teenwoordig gedurende die hele leeftyd.	Teenwoordig of afwesig.
Fotofobie.	++ tot +++	Onbekend	+ tot ++	0 tot ++	+ tot ++++	0 tot ++
Visuele vermoë.	20/50 tot 20/400.	Normaal of verlaag.	20/60 tot 20/200.	Normaal tot 20/100.	20/80 tot 20/400.	Normaal tot matig verlaag.
Serum tirosien vlakke.	Laag normaal tot normaal.	Onbekend.	Onbekend.	Onbekend.	Normaal.	Normaal.

Tabel 2.2 (vervolg)

Melanosome in haarwortels.	Fase 2 en 3 premelanosome. Geen fase 4 melanosome.	Verlaagde hoeveelheid fase 4 melanosome indien gehipopigmenteerd	Fase 2 en 3 premelanosome. Baie min fase 4 melanosome.	Fase 3 premelanosome en fase 4 melanosome.	Fase 1, 2 en 3 premelanosome.	Tot fase 4 melanosome. Reuse melanosome.
Inkubasie van haarwortels in tirosien.	Duidelike pigmentvorming sigbaar.	Onbekend.	Effense tot geen toename in pigmentasie.	Toename in pigmentasie.	Effense toename in pigmentasie.	Toename in pigmentasie.
Misgeleiding van optiese vesels.	Teenwoordig.	Teenwoordig indien persoon gehipopigmenteerd is.	Teenwoordig.	Onbekend.	Teenwoordig.	Teenwoordig of afwesig.
Ander.		Verstandelike vertraging en karakteristieke gedrag.	Tirosinase aktiwiteit is normaal.	Kom voor by mense van Nieu Guinea en swart mense van Afrika en Amerika.	Lisosomale siektetoestand, digte liggaampies van trombosiete is afwesig. Seroïed storingsdefek. Matige geneigdheid tot bloeding.	Lisosomale siektetoestand.

2.8.3 Chediak-Higashi sindroom.

Die kliniese beeld van die pasiënt, soos in hoofstuk 3 bespreek, het die meeste ooreenstemming getoon met die kenmerke van Chediak-Higashi sindroom. Om hierdie rede word die kenmerke van Chediak-Higashi sindroom hier in meer besonderhede bespreek.

Die Chediak-Higashi sindroom is 'n rare outosomaal resessiewe, dikwels fatale, siektetoestand wat gekenmerk word deur verhoogde vatbaarheid vir infeksie (Vincent & Spicer, 1981; Carillo-Farga *et al.*, 1990), hipopigmentering (Witkop, 1979; Ozaki *et al.*, 1994), die teenwoordigheid van reuse peroksidase-positiewe granules in leukosiete (White & Clawson, 1980; Grossi *et al.*, 1985) en ander selle, onder andere Schwannselle, gastriese mukosaselle, pankreaselle, nierselle en beenmurgselle (Kinnear *et al.*, 1985) en 'n gereigtheid tot oormatige bloeding (Jamison *et al.*, 1993). Pasiënte met hierdie sindroom ontwikkel dikwels in hul kinderjare reeds 'n progressiewe perifere en kraniale neuropatie (Blume & Wolff, 1972; Witkop *et al.*, 1989; Nantulya *et al.*, 1990) wat gepaard gaan met spierswakheid, verlaagde spiertendonreflekse, sensoriese verlies, abnormale elektro-ensefalogram, abnormale elektromiogram en soms konvulsies (Witkop *et al.*, 1989). Die neurologiese veranderinge wat plaasvind by volwassenes met hierdie siektetoestand toon ooreenstemming met die neurologiese veranderinge wat plaasvind by spinoserebrale degenerasie en parkinsonisme (Witkop *et al.*, 1989). Kinders wat vroeë infeksies oorleef, sterf dikwels voor volwassenheid as gevolg van 'n limforetikulêre infiltrasie van weefsels wat kwaadaardig kan wees (Kinnear *et al.*, 1985).

Die pigment in die vel, oë en hare van persone met Chediak-Higashi sindroom is verlaag, maar hul albinisme is gewoonlik nie opsigtelik nie (Ortonne *et al.*, 1983; Perou & Kaplan, 1993; King *et al.*, 1995). Hul hipopigmentering is die beste waarneembaar wanneer hul pigmentasie vergelyk word met dié van ongeaffekteerde familieleden (King *et al.*, 1995). Normale hoeveelhede melanosiete kom voor in die

vel, oë en hare van hierdie pasiënte (Ortonne *et al.*, 1983; Witkop *et al.*, 1989). Tirosinase aktiwiteitstoetse toon hoë vlakke van aktiwiteit in die haarwortels (Witkop *et al.*, 1989). Die verhoogde vatbaarheid vir infeksie by hierdie persone blyk die gevolg te wees van die teenwoordigheid van abnormale granules in neutrofiele en ander selle (Carrillo-Farga *et al.*, 1990). Die vorming van reuse melanosome, wat nie na keratinosiete oorgedra kan word nie, in melanosiete, lei tot die abnormale verspreiding van melanosome en hipopigmentering (Boissy *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 1994; King *et al.*, 1995). Behandeling van pasiënte met askorbiensuur verleen aan sommige pasiënte kliniese verbetering en verbeter leukosietfunksie *in vitro* (Kinnear *et al.*, 1985). Die beste behandeling tans vir hierdie siektetoestand is beenmurgoorplanting, wat groot verbetering bring by pasiënte asook 'n voorkoming in verdere agteruitgang (Durandy *et al.*, 1993; Harville *et al.*, 1994).

2.9 SAMEVATTING

Soos reeds genoem in hoofstuk 1, handel hierdie ondersoek oor 'n pasiënt wat reeds van geboorte af 'n vorm van hipopigmentering vertoon. In hierdie hoofstuk is 'n uiteensetting gegee van inligting uit die literatuur wat betrekking het op die selle en organelle waarin melanienbiosintese plaasvind asook die kenmerke van verskillende vorme van hipopigmentering. Vanuit hierdie inligting uit die literatuur kon 'n benaderingswyse tot die ondersoek van hipopigmentering by die pasiënt saamgestel word.

Hierdie hoofstuk bied ook 'n uiteensetting van inligting uit die literatuur aangaande die metaboliese weë waarlangs melanienbiosintese plaasvind en metaboliete afkomstig van hierdie weë in die uriene. Hierdie inligting is aangewend om 'n benaderingswyse tot die ondersoek van liggaamsvloeistofverdonkering saam te stel.

HOOFSTUK 3

MOTIVERING, DOELSTELLINGS EN BENADERINGSWYSE

3.1 INLEIDING

Die sentrale plek in hierdie ondersoek word ingeneem deur 'n elfjarige vroulike pasiënt. Reeds vanaf die ouderdom van ongeveer ses weke het die pasiënt tekens van ontwikkelingsvertraging begin toon tesame met 'n verskeidenheid ander onverklaarde simptome. Ondanks verskillende pogings om die oorsaak van haar agteruitgang vas te stel, kon die rede vir die vreemde assosiasie van simptome wat by die pasiënt voorkom, nie vasgestel word nie.

Hierdie ondersoek kan beskou word as 'n poging om meer insig te verkry in die oorsaak of oorsake van hierdie pasiënt se toestand. Ten einde 'n sistematiese en effektiewe benaderingswyse vir die ondersoek te formuleer, was dit ten eerste nodig om die kliniese geskiedenis van die pasiënt deeglik te ondersoek. Kliniese gegewens is verkry deur konsultasies van die pasiënt en ouers met verskeie geneeshere en spesialiste by te woon. Waardevolle kliniese inligting is ook verkry uit doktersverslae van vorige geneeshere wat die pasiënt behandel het.

3.2 NAVORSINGSMATERIAAL

3.2.1 Beskrywing van die kliniese geskiedenis van die pasiënt

Tabel 3.1 bevat 'n opsomming van die kliniese gegewens wat handel oor vier verskillende groeistadiums van die pasiënt.

Tabel 3.1: Die kliniese geskiedenis van die pasiënt

Eienskap	Groeistadium jonger as 1 jaar	Groeistadium 1 tot 3 jaar	Ouerdom 4 jaar en 5 maande	Ouderdom 7 tot 11 jaar (huidiglik)
Velkleur	Spierswit	Onbekend	Baie ligte vel kenmerkend van albinisme	'n Baie wit vel
Oogkleur	Regteroog was groen en linkeroog groen met bruin vlekke	Die selfde as gedurende die eerste lewensjaar	Die selfde as gedurende die eerste lewensjaar	Die selfde as gedurende die eerste lewensjaar
Spysverteringsprobleme	Nadat sy gespeen is het sy swak gereageer op verskeie melkformules. Sy het koliek gekry, aanhoudend gehuil, diaree gehad en opgehou om gewig op te tel.	Die pasiënt het erge hardlywigheid gekry wat voortdurend behandel moes word.	Onbekend.	Haar feses is baie droog alhoewel sy heelwat water drink. Sy ly aan erge hardlywigheid.
Dieet	Sy is gespeen op 'n ouderdom van ses weke. Verskeie melkformules het haar benadeel. Sy het weer begin gewig optel nadat sy Lofenalac melk (melk met 'n lae fenilalanien inhoud) begin gebruik het.		Sy is geplaas op 'n normale dieet wat gewone melk ingesluit het. Sy het geen nadelige reaksie hierop getoon nie.	Sy eet 'n dieet waarin rooivleis en eiers beperk is, asook gasvormende voedsels. Sy eet heelwat vrugte.
Gepigmenteerde vlekke op haar vel.	Geen	Op 'n ouderdom van drie jaar en ses maande word twee bruin vlekke op haar regterbeen opgemerk.	Onbekend.	'n Aantal sproete en gehiperpigmenteerde vlekke op haar nek en bene.
Kenmerke van albinisme	Algemene hipopigmentasie van haar vel en hare. Geen okulêre ondersoek is gedoen nie.	Onbekend.	Sy het die uitwendige kenmerke van albinisme getoon. Geen okulêre ondersoek is gedoen nie.	Baie ligte vel en hare. 'n Mate van pigment is deur die jare neergelê in haar vel en hare. Sy het nistagmus veral gedurende tye dat sy olik voel. Sy het fotofobie, 'n rooi refleks en strabismus. Swak visuele vermoë weens miopie. Haar okulêre pigmentasie is normaal, maar die optiese skywe is effens ligter as normaal. Die makula van haar oë is normaal.

Tabel 3.1 (vervolg)

Gewig en mates	Onbekend.	Onbekend.	Het nege kg geweeg en 'n hoofonttrek van 45 cm gehad.	Weeg tussen 12 en 15 kg. Haar hoofonttrek is 47 cm en haar liggaamslengte 100 cm.
Groei en motoriese ontwikkeling	Groei was normaal tot op 'n ouderdom van twee maande, waarna haar groei afgeplat het. Vanaf nege maande het haar groei baie min gevorder.	Sy het spastisiteit van haar ledemate getoon wat met Sinemet behandel is.	Sy het uitgereik na voorwerpe op 'n ongekoördineerde wyse en kon nie sonder ondersteuning sit nie. Haar ledemate was spasties met vinnige tendonreflekse en ekstensorreflekse van die voetsool. Sy het spastiese kwadruplegie gehad.	Haar groei is uit persentiel. Haar spiere is onderontwikkel, maar die spierreflekse van haar arms en bene is goed. Sy kan nie loop, kruip of sonder ondersteuning sit nie. Sy hoor goed maar sien ongeveer slegs twee meter ver.
Intellektuele ontwikkeling	Onbekend.	Sy het begin om 'n paar woorde te sê en te probeer kommunikeer.	Sy het 'n erge ontwikkelingsvertraging getoon.	Sy het 'n woordeskat van ongeveer 15 woorde. Sy is bewus van mense rondom haar en toon emosie. Soms het sy tydperke van afwesigheid waartydens sy nie kan kommunikeer nie.
Neurologiese probleme	Op 'n ouderdom van nege maande het sy vir die eerste maal konvulsies gekry.	Sy het konvulsies gekry, soms tesame met 'n baie hoë koors.	Sy was 'n erge marasmiese, mikrocefaliese kind. Rekenaartomografie skandering het minimale serebrale atrofie getoon. Sy het epilepsie gekry.	Die rekenaartomografie skandering van haar brein toon 'n mate van atrofie van die linkerbrein; moontlik die gevolg van 'n serebro-vaskulêre insident. 'n Elektroensefalografiese ondersoek het groot abnormaliteite getoon, en sy moet dus medikasie neem om epilepsie te onderdruk.
Algemene gesondheids-toestand	Sonder komplikasies gebore op 2 Januarie 1986. Haar gesondheidstoestand het dramaties verswak nadat sy gespeen is, aangesien verskeie melkformules haar nadelig beïnvloed het.	Haar weerstand teen siektes was laag en sy het dikwels infeksies van die blaas en spysverteringskanaal gekry. Met tye, gewoonlik gedurende tye van infeksie, was sy baie swak, sonder energie en belangeloos.	Onbekend.	Haar algemene gesondheidstoestand is wisselend. Sy kry soms dae wanneer sy bleker en moeër voorkom, haar pupille vergroot is en sy maagpyn het. Wanneer sy deur 'n periode van swak gesondheid gaan, gewoonlik weens infeksies van die blaas en spysverteringskanaal, verloor sy soms die vermoë om te kan praat en die gebruik van sommige ledemate.

Medikasie	Fenobarbitoon en valium vir die behandeling van epilepsie. Verskeie medikamente vir die behandeling van hardlywigheid. Hidroksitriptofaan om self-mutulasie te onderdruk. Sinemet, wat die akteiwes bestanddele L-DOPA en karbidopa bevat, is voorgeskryf om simptome van parkinsonisme en die spastisiteit van haar ledemate te verlig.	Die medikasie was dieselfde as gedurende die groeistadium jonger as een jaar.	Dieselfde as vir die groeistadium jonger as een jaar.	Behandel met Sinemet, fenobarbitoon en medikasie vir hardlywigheid. Gedurende die einde van haar tiende jaar is Sinemet behandeling vir 'n tydperk van ongeveer twee maande onttrek.
Reaksies op medikasie.	Haar ledemate was meer soepel en sy was minder geïrriteerd, moontlik weens die Sinemet behandeling.	Sy het 'n teenreaksie getoon wanneer die dosis Sinemet gewysig is.	Onbekend.	Volgens haar geneesheer is die geringe verdonkering van haar hare te wyte aan L-DOPA behandeling. Die volgende verskynsels is opgemerk nadat Sinemet medikasie onttrek is: *Haar hardlywigheid het verdwyn. *Sy was meer bewus van haar omgewing. *Sy kon haar regterhand, wat voorheen spasties was, weer gebruik. Hierdie hand het egter soms bewerigheid getoon nadat Sinemet onttrek is. Ongeveer twee maande na die onttrekking van Sinemet het die pasiënt hewige, onwillekeurige rukkewegings van haar ledemate begin toon. Daarom word sy tans weer met Sinemet behandel.

Diagnostiese toetse reeds gedoen	Die moontlikheid van fenielketonurie is ondersoek, maar die resultate was negatief.	Onbekend.	Organiese suur en aminosuurprofiel was normaal.	'n Bloedseltelling van April 1995 het getoon dat normale hoeveelhede bloedselle in die sirkulasie voorgekom het. Die leukosiete het egter toksiese granulering getoon.
Vreemde simptome.	Die feit dat slegs Lofenalac melkformule haar nie benadeel het nie.	Haar sweet en speeksel het soms haar kleres swart gekleur. Haar urine het haar doeke grys gekleur en het 'n skerp, suur, muwwerige reuk gehad.		Sy kry dikwels seertjies op haar hande en bene wat etterig word. * Haar lewer is soms effens vergroot, maar haar milt en kliere nie. * Soms, veral in die nag terwyl sy slaap, sweet sy geweldig alhoewel haar liggaam yskoud voel. Alhoewel sy heelwat water drink bly sy dors en is haar mond droog. * Gedurende periodes van swak algemene gesondheid verdonker die urine, speeksel en sweet van die pasiënt soms. Dié vloeistowwe het aanvanklik 'n normale kleur, maar nadat dit vir 'n tyd lank aan lug blootgestel is, verdonker dit geleidelik. Volgens haar geneesheer het hierdie verdonkering gewoonlik plaasgevind na verhoogde proteïenname.

3.2.2 Die familieagtergrond van die pasiënt

Die families van die vader en moeder (Strydom en Ferreira) is nie verwant nie. Geen gevalle van verstandelike vertraging of porfirie is bekend in die familieagtergrond nie. Die vader se ma kan nie proteïene eet nie en die moeder se pa het parkinsonisme gehad. Die pasiënt het 'n ouer suster en jonger broer wat normaal is behalwe dat die suster afwesighede, 'n matige vorm van epilepsie, kry. Die pasiënt se moeder het 'n baie groot gehipopigmenteerde area op haar regterbeen asook ligte hare, liggroen oë en ligte oogwimpers wat daarop dui dat sy moontlik die draer is van 'n geen wat pigmentasie beïnvloed.

3.2.3 'n Kritiese beskouing van die kliniese geskiedenis van die pasiënt

Die pasiënt vertoon verskeie eienskappe wat kenmerkend is van OKA, naamlik aangebore hipopigmentering van haar vel en hare, nistagmus, fotofobie, 'n rooi refleks en verlaagde visuele vermoë (Witkop, 1979; Witkop *et al.*, 1989). Die pigmentasie van haar oë is egter normaal en die makula van haar oë toon ook nie die onderontwikkeling van die fovea wat 'n belangrike kenmerk van OKA is nie (King *et al.*, 1995). Slegs die optiese skywe van haar oë is effens ligter as normaal. Die feit dat die pigmentasie van haar oë feitlik normaal is en geen hipoplasia van die fovea voorkom nie, skep die indruk dat hierdie pasiënt eerder 'n vorm van albinoidisme as albinisme het (Kinnear *et al.*, 1985). Die voorkoms van nistagmus, fotofobie, 'n rooi refleks en verlaagde visuele vermoë dui weer eerder op 'n vorm van OKA (Witkop *et al.*, 1989).

Meeste van die vorme van OKA wat in hoofstuk 2 bespreek is, toon duidelike hipopigmentering van die oë tesame met die kenmerke van hipoplasia van die fovea, abnormale oorkruising van optiese vesels by die optiese chiasma, fotofobie, nistagmus, verlaagde visuele vermoë, ensovoorts (Kinnear *et al.*, 1985; Witkop *et al.*, 1989; King *et al.*, 1995). Persone met Chediak-Higashi

sindroom albinisme toon die diagnostiese kenmerke van albinisme, maar by sommige persone met Chediak-Higashi sindroom albinisme is sommige van die kenmerke afwesig (Witkop *et al.*, 1989; King *et al.*, 1995). Die mees kritiese diagnostiese kenmerk van OKA, naamlik die abnormale oorkruising van optiese vesels by die optiese chiasma, word nie vertoon deur sommige pasiënte met Chediak-Higashi sindroom nie (King *et al.*, 1995). Ook okulêre hipopigmentering is by sommige Chediak-Higashi sindroom pasiënte minder dramaties as by ander vorme van albinisme (Witkop *et al.*, 1989). Sommige Chediak-Higashi sindroom pasiënte kan selfs normale irispigmentasie hê en slegs matig verlaagde pigmentasie van die fundus (Witkop *et al.*, 1989).

'n Verhoogde vatbaarheid vir infeksie, neurologiese afwykings wat gepaard gaan met konvulsies en vertraging in liggaamlike en verstandelike ontwikkeling is uitstaande kenmerke van die kliniese beeld van die pasiënt. Vatbaarheid vir infeksie, neurologiese probleme geassosieer met konvulsies en die verlies van die gebruik van ledemate en vertraging in verstandelike ontwikkeling kom nie voor by die oorgrote meerderheid vorme van OKA nie (Ortonne *et al.*, 1983; Witkop *et al.*, 1989; King *et al.*, 1995). Chediak-Higashi sindroom albinisme word veral gekenmerk deur 'n verhoogde vatbaarheid vir infeksie (Vincent & Spicer, 1981; Carillo-Farga *et al.*, 1990). Kinders met Chediak-Higashi sindroom ontwikkel dikwels 'n progressiewe perifere en kraniale neuropatie (Blume & Wolff, 1972; Witkop *et al.*, 1989; Nantulya *et al.*, 1990). Hierdie neuropatie gaan gepaard met spierswakheid, verlaagde spiertendonreflekse, sensoriese verlies, abnormale elektro-ensefalogram, abnormale elektromiogram en konvulsies (Witkop *et al.*, 1989).

Dit is duidelik dat die pasiënt verskeie eienskappe vertoon wat normaalweg nie voorkom by meeste vorme van albinisme nie, maar wat kenmerkend is van Chediak-Higashi sindroom albinisme. Sommige eienskappe wat kenmerkend is van Chediak-Higashi sindroom albinisme kom egter nie by hierdie pasiënt voor nie. 'n Belangrike kenmerk van Chediak-Higashi sindroom is die ontwikkeling van 'n versnelde fase van die siektetoestand gekenmerk deur anemie, trombositopenie, neutropenie, geelsug,

splenomegalie, hepatomegalie en 'n limforetikulêre infiltrasie van weefsels wat kwaadaardig kan wees (Witkop, 1971; Ortonne *et al.*, 1983). Daar is opgemerk dat die lewer van die pasiënt soms vergroot is, maar geen vergroting van die milt of limfkliere is in die verlede opgemerk nie. Volgens haar ouers het sy in die verlede soms anemie gehad, maar bloedtoetse wat in 1995 gedoen is het normale getalle rooibloedselle, witbloedselle en bloedplaatjies in die sirkulasie getoon. 'n Vorm van geelsug waar die oogappels geel word en ook agter die ore 'n liggeel kleur sigbaar word is al by die pasiënt opgemerk gedurende tye dat sy ongesteld was. Geen kwaadaardige limforetikulêre infiltrasie van weefsels is nog ooit by die pasiënt geïdentifiseer nie. Volgens Witkop *et al.* (1989) ontwikkel die versnelde fase van die siektetoestand gewoonlik by pasiënte van agt tot 18jarige ouderdom. Pasiënte gaan geweldig vinnig agteruit gedurende die versnelde fase en meeste pasiënte sterf uiteindelik as gevolg daarvan (Kinnear *et al.*, 1985). Die moontlikheid bestaan dat indien hierdie pasiënt inderdaad Chediak-Higashi sindroom het, die versnelde fase nog by haar sal ontwikkel. 'n Uiteens belangrike diagnostiese kenmerk van Chediak-Higashi sindroom albinisme is die voorkoms van reuse peroksidase-positiewe lisosomale granules binne leukosiete. Bloedtoetse wat gedoen is gedurende April 1995 het abnormale granulering van leukosiete aangetoon. Medici was egter onseker of hierdie granulering wel die kenmerkende Chediak-Higashi granules was. Neurologiese veranderinge wat plaasvind by volwasse persone met Chediak-Higashi sindroom toon ooreenstemming met die simptome van parkinsonisme (Witkop *et al.*, 1989). Dit is interessant dat hierdie pasiënt oorspronklik met Sinemet behandel is aangesien sy simptome van parkinsonisme getoon het. Daar het duidelik 'n moontlikheid bestaan dat hierdie pasiënt Chediak-Higashi sindroom kon hê.

Die aangebore hipopigmentering van die pasiënt asook ander kenmerke van albinisme wat by die pasiënt voorkom, dui op die moontlikheid dat daar 'n aangebore defek in die melanien biosintese-weg by die pasiënt voorkom. Die teenwoordigheid van pigment in die oë van die pasiënt, gepigmenteerde vlekke op haar vel en die feit dat haar hare verdonker het soos sy ouer

geword het, dui daarop dat sy nie tirosinase negatiewe albinisme het nie (Witkop, 1983). Daar kom dus wel tirosinase aktiwiteit voor in die pigmentselle van die pasiënt. Dit is moontlik dat 'n defek kan voorkom by 'n ander, ongeïdentifiseerde punt in die melanien biosintese-weg.

Indien daar by die pasiënt 'n defek voorkom in die melanien biosintese-weg na die tirosinase gekataliseerde hidrosilering van tirosien en oksidering van L-DOPA, sal sekere intermediêre van die melanien biosintese-weg ophoop in die liggaam. Hierdie intermediêre en hul metaboliete kan dan in verhoogde vlakke in liggaamsvloeistowwe voorkom en in verhoogde vlakke in uriene uitgeskei word. Die uriene, speeksel en sweet van die pasiënt verdonker soms wanneer dit aan lug blootgestel word. Die eindproduk van die eumelanien biosintese-weg is 'n swart polimeer en verskeie intermediêre in hierdie biosintese-weg kan spontaan outo-oksideer na melanien (Hearing & Tsukamoto, 1991). Verhoogde vlakke van melanienverwante metaboliete in die uriene, speeksel en sweet kan dan lei, deur outo-oksidering, tot die verdonkering van hierdie liggaamsvloeistowwe (Banda *et al.*, 1977; McClements *et al.*, 1988; Boivin *et al.*, 1993). Daar bestaan dus 'n moontlikheid dat 'n defek in die melanien biosintese-weg verantwoordelik kan wees vir die verdonkering van sekere liggaamsvloeistowwe van die pasiënt. Volgens 'n geneesheer van die pasiënt het verdonkering van liggaamsvloeistowwe by die pasiënt gevolg op 'n verhoogde proteïeninnome.

Die Sinemet medikasie wat die pasiënt daaglik neem is 'n tablet wat die aktiewe bestanddele L-DOPA en karbidopa [(-)-L- α -hidrazino-3,4-dihidroksi- α -metielbenseenpropioonsuur] bevat. Hierdie twee bestanddele kom in haar medikasie voor in 'n verhouding van 25 mg karbidopa tot 100 mg L-DOPA. Karbidopa inhibeer die perifere dekarboksilering van L-DOPA na dopamien en verseker sodoende dat hoër konsentrasies L-DOPA deur die bloedsreinskans kan beweeg tot in die brein.

Volgens Pinder *et al.* (1976) word karbidopa as volg in die liggaam gemetaboliseer: Ongeveer 30 % van die totale dosis karbidopa word onveranderd uitgeskei in uriene en 41 tot 55 % in feses. Karbidopa ondergaan syketting degradasie en word uitgeskei in uriene as die glukuronied konjugate van α -metiel-3-(3-metoksi-4-hidroksifeniel)propioonsuur (10-14 % van totale orale dosis), α -metiel-3-(3,4-dihidroksifeniel)propioonsuur (10 % van totale orale dosis) en 3,4-dihidroksifenielasetoon (5 % van totale orale dosis). Karbidopa ondergaan ook aromatiese dehidroksilering na α -metiel-3-(3-hidroksifeniel)propioonsuur (10 % van totale orale dosis). Die newe-effekte van die gebruik van karbidopa soos beskryf deur Budavari (1989) en Reynolds (1993) sluit nie die verdonkering van liggaamsvloeistowwe in nie. Volgens Goodman Gilman *et al.* toon karbidopa geen farmakologiese aktiwiteit wanneer dit alleen toegedien word nie, en die newe-effekte van karbidopa wanneer dit toegedien word in kombinasie met L-DOPA is die gevolg van die bevordering van die effekte van L-DOPA.

L-DOPA is egter 'n intermediêr in die melanien biosintese-weg en hierdie verbinding kan in oplossing outo-oksideer na melanien (Altmann, 1980; King *et al.*, 1995). Hierdie medikasie oefen dus 'n direkte invloed uit op die melanien biosintese-weg, en dit mag moontlik deur outo-oksidering self direk verantwoordelik wees vir die verdonkering van die uriene, speeksel en sweet van die pasiënt. Dit is egter vreemd dat hierdie verdonkering sporadies, soms slegs twee of drie maal per jaar, plaasvind alhoewel die pasiënt daagliks met 'n konstante dosis Sinemet behandel word.

As baba het die pasiënt goed gevorder terwyl sy moedersmelk gedrink het. Die groot agteruitgang by die kind het begin toe sy op 'n ouderdom van ses weke melkformules begin drink het. Die enigste melkformule wat sy kon gebruik was Lofenalac melk. Hierdie melkformule bevat minder fenielalanien as ander formules en word gewoonlik voorgeskryf vir fenielketonurie pasiënte. Hierdie pasiënte is nie in staat om fenielalanien normaal te

metaboliseer nie (Mathews & Van Holde, 1990). Feniellalanien word dan deur alternatiewe metabolisme weë gemetaboliseer (Martin *et al.*, 1985). Hierdie alternatiewe metaboliete en feniellalanien self word in verhoogde vlakke in die uriene van pasiënte uitgeskei (Mathews & Van Holde, 1990). Geen verhoogde vlakke van feniellalanien of die alternatiewe metaboliete daarvan kon tot dusver in die uriene en serum van die pasiënt waargeneem word nie. Die geneesheer van die pasiënt het voorgestel dat Lofenalac in die verlede voordelig was vir die pasiënt aangesien dit 'n lae proteïeninhoud het.

Twee simptome wat die pasiënt reeds lank vertoon is erge hardlywigheid en 'n voortdurende dors en droogheid van haar mond alhoewel sy heelwat water inneem. Daar is egter opgemerk dat haar hardlywigheid opgehou het gedurende die tydperk dat sy geen Sinemet gebruik het nie. Hardlywigheid het weer verskyn vandat weer met Sinemet medikasie begin is. Sommige van die bekende gastro-intestinale newe-effekte van Sinemet medikasie is hardlywigheid en droogheid van die mond (Pinder *et al.*, 1976; Reynolds, 1993). Hierdie simptome is dus duidelik die gevolg van Sinemet medikasie. Alhoewel Sinemet-onttrekking verligting gebring het van nadelige newe-effekte soos hardlywigheid, het onwillekeurige rukkewegings van die pasiënt se ledernate begin plaasvind nadat Sinemet heeltemal verwyder is. Daar bestaan onsekerheid of hierdie rukkewegings dui op 'n tekort aan DA in die liggaam en of dit bloot onttrekkingssimptome was. Om die gevaar van epileptiese aanvalle te vermy is eerder weer met Sinemet-behandeling begin.

3.3 MOTIVERING VIR HIERDIE ONDERSOEK

Die pasiënt vertoon unieke eienskappe. Dit is ongewoon dat 'n persoon 'n vorm van algemene hipopigmentering van vel, hare en/of oë het en tesame daarmee 'n verdonkering van liggaamsvloeistowwe vertoon (Ortonne *et al.*, 1983). Ook die assosiasie van verstandelike vertraging met 'n vorm van

algemene hipopigmentering van die vel, hare en/of oë is raar, aangesien albino persone gewoonlik normale verstandelike vermoëns het (Witkop *et al.*, 1989). Slegs by sekere rare vorme van okulokutaneuse en kutaneuse hipopigmentering het die pasiënt beide 'n vorm van verstandelike vertraging en hipopigmentering (Kinnear *et al.*, 1985). Dit is dus moontlik dat hier sprake is van 'n unieke siektetoestand wat nog nooit voorheen beskryf is nie. Die ondersoek en beskrywing van 'n nuwe siektetoestand het groot waarde aangesien dit lei tot die uitbreiding van wetenskaplike kennis en nuwe deure open vir verdere wetenskaplike ondersoek.

Daar bestaan 'n moontlikheid dat die simptome van die pasiënt verband hou met mekaar. Die uriene, speeksel en sweet van die pasiënt het soms swart geword. Die produk van die eumelanien biosintese-weg is 'n donkerbruin na swart polimeer (Ito, 1993). Dit is duidelik vanuit die kliniese kenmerke van die pasiënt dat daar moontlik 'n defek kan voorkom in die melanien biosintese-weg by die pasiënt, aangesien sy baie kenmerke vertoon wat ooreenstem met sekere van die kenmerke van albinisme en albinoidisme. Dit het die vraag laat ontstaan of die verdonkering van liggaamsvloeistowwe verband hou met die beeld van hipopigmentering. Indien daar wel 'n verband bestaan kan 'n ondersoek van hierdie pasiënt waardevol wees om meer insig te verkry in die melanien biosintese-weg. Daar is sommige van die vorme van okulokutaneuse en kutaneuse hipopigmentering waarvoor die onderliggende biochemiese of ultrastrukturele defek nie bekend is nie (Ortonne *et al.*, 1983; Kinnear *et al.*, 1985; King *et al.*, 1995). Die wyse waarop sekere stappe in die melanien biosintese-weg, veral die finale polimiseringsstappe van quinone en bensotiasien intermediêre tot melanien, plaasvind is nog nie duidelik nie (Constantini *et al.*, 1990). 'n Ondersoek van die ultrastruktuur van die melanosiete van die pasiënt asook die identifikasie van die swart pigment wat in die liggaamsvloeistowwe uitgeskei is, kan dus moontlik van groot nut wees om meer insig te verkry in die melanien biosintese-weg.

Die bevindinge van hierdie ondersoek kan moontlik ook tot nut wees vir die familie van die pasiënt. Sekere fasette van die agteruitgang van die pasiënt,

byvoorbeeld die verstandelike vertraging, is onomkeerbaar. Deur egter meer inligting te verkry omtrent die presiese aard van hierdie pasiënt se toestand, kan die pasiënt meer effektief versorg en behandel word, en kan verdere agteruitgang selfs verhoed word.

Sy vertoon veral heelwat eienskappe wat kenmerkend is van 'n rare vorm van OKA, genaamd Chediak-Higashi sindroom albinisme. Hierdie vorm van albinisme is 'n siektetoestand wat dikwels fataal is en wat gekenmerk word deur progressiewe neuropatie, verhoogde vatbaarheid vir infeksie en die ontwikkeling van 'n versnelde fase van die siektetoestand wat dikwels lei tot die dood van pasiënte (Kinnear *et al.*, 1985; Carillo-Farga *et al.*, 1990; Nantulya *et al.*, 1990). Pasiënte kan baie suksesvol behandel word deur beenmurgoorplanting en in sommige gevalle was behandeling van infeksies en die versnelde fase van die siekte met askorbiensuur en sterciede suksesvol (Kinnear *et al.*, 1985). Vroegtydige behandeling kan verdere neurologiese agteruitgang en die ontwikkeling van die versnelde fase stuit (Durandy *et al.*, 1993; Harville *et al.*, 1994). Abnormale granules is opgemerk in die bloedselle van die pasiënt, maar daar het onsekerheid bestaan of hierdie abnormale granules die kenmerkende Chediak-Higashi granules was. Dit was in belang van die pasiënt dat vasgestel moes word of sy wel Chediak-Higashi sindroom albinisme het sodat sy vroegtydig behandel kon word voor die ontwikkeling van die versnelde fase van die siektetoestand.

3.4 DIE DOELWITTE VAN HIERDIE ONDERSOEK

Die twee hoofdoelwitte van hierdie ondersoek was:

- (1) Om te bevestig of die pasiënt wel Chediak-Higashi sindroom albinisme het.

- (2) Om vas te stel of verhoogde vlakke van melaniënverwante metaboliete verantwoordelik is vir die sporadiese verdonkering van uriene, speeksel en sweet wat by die pasiënt waargeneem word in die lig van volgehoue Sinemet toediening.

3.5 DIE BENADERINGSWYSE TOT HIERDIE ONDERSOEK

Vir die doel van hierdie ondersoek is veral gefokus op die volgende fasette van die melaniën biosintese: die selle en organelle waarbinne melaniënbiosintese in die liggaam plaasvind en die spesifieke metaboliese weë waarlangs melaniën in hierdie selle en organelle gesintetiseer word, asook die ekskresie van melaniënverwante verbindings in die uriene.

Ten einde die eerste doelwit van hierdie ondersoek te bereik is haarwortel melanosiete en keratinosiete van die pasiënt ondersoek deur middel van transmissie-elektronmikroskopie. Daar is gepoog om ultrastrukturele defekte van melanosome, melanosiete en keratinosiete waar te neem en melanosiete is veral ondersoek vir die teenwoordigheid van reuse melanosome.

Ten einde die tweede doelwit van hierdie ondersoek te bereik is verskillende melaniënverwante metaboliete deur middel van 'n verskeidenheid van tegnieke in veral die uriene van die pasiënt gekwantifiseer. Die vlakke van melaniënverwante metaboliete in uriene gedurende tydperke van liggaamsvloeistofverdonkering is vergelyk met die urinêre vlakke van hierdie verbindings gedurende tydperke dat liggaamsvloeistofverdonkering nie plaasgevind het nie. Vanuit so 'n vergelyking kon vasgestel word of urinêre vlakke van hierdie metaboliete verhoog is gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering relatief tot urinêre vlakke gedurende tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Die swart verbinding is uit die klere van die pasiënt geëkstraheer en daar is gepoog om hierdie verbinding deur middel van vergelykende analyses te identifiseer.

HOOFSTUK 4

EKSPERIMENTELE METODEDES

4.1 Die ultrastrukturele ondersoek van haarwortel melanosiete en keratinosiete

4.1.1 Die voorbereiding van materiaal vir elektronmikroskopiese ondersoek

Enkel hare is gemonster uit die kopvel van onderskeidelik die pasiënt en kontrole persone. Die geplukte hare is onmiddellik in Todd's fikseermiddel (Todd, 1986) geplaas vir 'n tydperk van twee na ses ure. Na die eerste fikseringstap is haarwortels drie maal vir tien minute in 0.05 M kakodilaatbuffer gewas. Hierna is die haarwortels gepostfikseer deur dit vir een uur te inkubeer in 'n 0.5-1 % osmiumtetroksiedoplossing (opgemaak in gedistilleerde water). Die haarwortels is na post-fiksering drie maal vir tien minute telkens gewas in gedistilleerde water. Hierna is dit vir 30 minute gekleur met twee % uranielasetaat (opgemaak in gedistilleerde water). Die haarwortels is weereens drie maal gewas met gedistilleerde water. Hierna is die haarwortels stelselmatig gedehidreer deur dit telkens vir 15 minute te inkubeer in 'n asetoonreeks van 'n toenemende konsentrasie asetoon (50 %, 70 %, 90 %, 100 % en 100 % asetoon in water).

Die 100 % asetoon droogmiddel is vervang met 'n 1:1 (v/v) mengsel van asetoon en Spurr se hars. Die haarwortels is drie ure in hierdie 1:1 (v/v) mengsel gelaat om af te sak na die bodem van die houertjie waarin voorbereiding van materiaal gedoen is. Die 1:1 (v/v) mengsel is vervang met vars opgemaakte 100 % hars en die haarwortels is vir vyf ure of oornag daarin gelaat om af te sak na die bodem van die houertjie. Die 100 % hars van die vorige stap is vervang met vars opgemaakte 100 % hars en die haarwortels is twee ure daarin gelaat. Die materiaal is daarna ingebed in vars

100 % hars in gietvorms en is geset by 70°C vir agt ure of oornag. Ultradun snitte (100 nm dik) is van die haarwortels gemaak met 'n Reichert Ultracut mikrotroom. Die haarwortels is veral in die lengte deur gesny. Meeste van die haarwortels was in die anageen fase van groei. Verkieslik is slegs snitte gemaak van haarwortels gefikseer in hierdie groeifase, aangesien dit die groeifase is waartydens aktiewe melanogenese in die melanosiete plaasvind (Boissy, 1988). Haarwortels is ondersoek deur middel van 'n dissekteermikroskoop. Haarwortels wat die kenmerkende eienskappe van die anageen groeifase getoon het, is gebruik vir die maak van snitte. Die snitte is versigtig oorgedra op koper-palladium roostertjies. Die snitte op die roostertjies is vir drie minute gekleur met twee % uranielasetaat (opgemaak in gedistilleerde water) en is daarna versigtig gespoel met gedistilleerde water. Hierna is die snitte vir een minuut gekleur met loodsitraat en weereens afgespoel met gedistilleerde water. Die gekleurde snitte op die koper-palladium roostertjies is ondersoek deur middel van 'n Phillips CM10 transmissie-elektronmikroskoop met 'n werkspanning van 80 of 100 kV en by verskeie vergrotings.

Die L-DOPA-reaksie

Na die eerste fikseringstap in Todd's fikseermiddel is sommige haarwortels vir 2.5 uur in 'n 0.1 % L-DOPA-oplossing (opgemaak in 0.1 M natriumfosfaatbuffer, pH 6.8) geïnkubeer. Die oplossing is na 2.5 uur met vars 0.1 % L-DOPA-oplossing geruil en haarwortels is vir 'n verdere twee ure in die vars oplossing geïnkubeer. Die geïnkubeerde haarwortels is verder net soos die haarwortels, wat nie in L-DOPA-oplossing geïnkubeer is nie, geprosesseer.

4.1.2 Aantoning van melanosiete en keratinosiete in die weefselsnitte

Lengte-snitte van haarwortels is deur middel van transmissie-elektronmikroskopie ondersoek. Ten eerste is gepoog om die melanosiete in die haarwortel op te spoor.

In 'n poging om die melanosiete in die snitte op te spoor is veral gesoek na selle wat die volgende kenmerke vertoon het:

Dendritiese selle wat nie tonofilamentbondels in hul sitoplasma of desmosome in hul selmembrane besit het nie (Ortonne *et al.*, 1983; Boissy, 1988). Selle wat ronde of ellipsvormige granules bevat het, waarin 'n swart elektrondigte stof voorgekom het (Szabo *et al.*, 1972; Fawcett *et al.*, 1994). In sommige van hierdie granules, die melanosome, kon lamelle waargeneem word. Melanosome in 'n verskeidenheid ontwikkelingsfases kom gewoonlik ongeaggregeerd verspreid in die sitoplasma van die melanosiet voor (Jimbow *et al.*, 1979).

In 'n poging om die keratinosiete van die melanosiete te onderskei is veral gelet op die volgende onderskeidende kenmerke: Heelwat tonofilamentbondels is sigbaar in die sitoplasma van keratinosiete (Fawcett *et al.*, 1994). Keratinosiete is in verbinding met die selle wat hulle omring deur desmosome wat in die selmembrane van hierdie selle voorkom (Zelickson, 1967; Breatnach, 1975). In die keratinosiete van blanke persone kom melanosome voor as aggregate van twee of meer melanosome binne membraangebonde organelle (Szabo *et al.*, 1972; Ortonne *et al.*, 1983). Die teenwoordigheid van tonofilament bondels in die sitoplasma van keratinosiete veroorsaak dat die sitoplasma van hierdie selle meer donker en dig vertoon in elektronmikrograwe as die sitoplasma van melanosiete (Ham & Cormack, 1979). Die haarwortel melanosiete van die pasiënt is ondersoek vir die

teenwoordigheid van reuse melanosome kenmerkend van Chediak-Higashi-sindroom.

4.2 ONDERSOEK OOR LIGGAAMSVLOEISTOFVERDONKERING

4.2.1 Hantering van fisiologiese monsters

Urienemonsters is direk na monsterneming bevries by -20°C . Met ontvangs in die laboratorium is die monsters ontvries. 'n Gedeelte van elke monster is aangesuur tot pH twee en bevries by -70°C . Hierdie aangesuurde uriene is later aangewend vir die kwantifisering van L-DOPA, DA, 5SSD, OMD, 6H5MI2K en organiese sure. Die ander gedeelte van elke urienemonster is nie aangesuur nie maar weer bevries en bewaar by -70°C . Die onaangesuurde uriene is later aangewend vir siftingstoetse, kreatinienbepalings en kwantitatiewe aminosuuranalises.

4.2.2 Siftingstoetse vir die ondersoek van moontlike oorsake van liggaamsvloeistofverdonkering

4.2.2 (a) Algemene sifting

Die pasiënt se uriene is ondersoek vir abnormale pH-waarde, verhoogde vlakke van proteïene, bloed, hemoglobien, ketone en glukose deur gebruik te maak van labstix. Hierdie reagensstrokies is vlugtig in die uriene gedloop en enige kleursverandering is genoteer. Deur kommersieel beskikbare sulfistix vlugtig in uriene te doop, is die uriene van die pasiënt ondersoek vir verhoogde vlakke van sulfiete. By een ml van 'n urienemonster is een clinitest tablet gevoeg. Hierdie toets dui verhoogde vlakke van glukose of ander reduserende suikers in die uriene aan (Gray, 1974). Verder is ook vir die volgende verbindings getoets aangesien verhoogde vlakke van hierdie verbindings uriene kan laat verdonker (McClements *et al.*, 1988):

4.2.2 (b) Toets vir verhoogde vlakke van indoliese melanogene

Die Thormählen-reaksie soos beskryf deur Scott *et al.* (1988) is uitgevoer om te toets vir verhoogde vlakke van indoliese melanogene in die uriene. By een ml van die pasiënt se uriene in 'n proefbuis is 0.2 ml natriumnitroprussiedoplossing (20 g/l) gevoeg en die inhoud van die buis is deeglik vermeng. Hierby is 0.2 ml 100 g/l natriumhidroksiedoplossing gevoeg en weereens is die inhoud van die buis vermeng. 'n Amber tot baksteenrooi kleur het ontstaan wat vinnig begin vervaag het. Daar is een minuut gewag waarna 0.2 ml ysasynsuur bygevoeg is en die buis se inhoud weer vermeng is. Die kleur van die monster is genoteer. 'n Amber kleur is negatief, blou is positief en 'n groen kleur dui op 'n dubbelsinnige resultaat. Om vas te stel of die groen kleur op 'n positiewe resultaat dui is 'n absorpsie golflengteskandering van die monsters oor die golflengte-gebied 450 tot 750 nm uitgevoer deur middel van 'n Beckman DU 7500 spektrofotometer. Die blou kleurstof wat 'n positiewe resultaat aandui absorbeer lig maksimaal by 610-620 nm. As 'n positiewe kontrole is indool (200 mg/l opgemaak in gedistilleerde water) gebruik.

4.2.2 (c) Toets vir urobilien

Hierdie siftingstoets is uitgevoer volgens die metode van Schlesinger (Gray, 1974). Twee ml uriene is geplaas in 'n proefbuis. Hierby is twee druppels jodiumtinktuur (sewe g jodiumkristalle tesame met vyf g kaliumjodied opgelos in vyf ml gedeïoniseerde water opgemaak tot 100 ml met 96% etanol) gevoeg. Een g sinkasetaat is opgeskud met vyf ml absolute etanol in 'n ander proefbuis. Die twee proefbuise se inhoud is vermeng deur dit oor en weer by mekaar te gooi. Hierdie mengsel is gefiltreer tot in 'n ander buis en die filtraat in die buis is bekyk vir fluoressensie teen 'n swart agtergrond terwyl 'n skerp

lig, byvoorbeeld 'n UV-ligbron, van die kant af deur die buis skyn. 'n Geelgroen fluoressensie dui op 'n positiewe toets vir urobilien.

4.2.2 (d) Toets vir verhoogde urobilinogeen en porfobilinogeen

Hierdie siftingstoets is uitgevoer volgens die metode beskryf deur Gray (1974). By een ml uriene in 'n proefbuis is een ml Ehrlich reagens (230 mg para-dimetielaminobensaldehid opgelos in 50 ml gekonsentreerde HCl (waterstofchloried) en opgemaak tot 84 ml met gedistilleerde water) gevoeg en die inhoud van die buis is deeglik vermeng. Hierby is twee ml van 'n versadigde, waterige oplossing van natriumasetaat gevoeg. Die inhoud van die buis is deeglik vermeng en daar is genoteer of die kleur in die buis verdiep het. Twee ml amiel-bensielalkohol mengsel (300 ml amielalkohol vermeng met 100 ml bensielalkohol) is hierby gevoeg. Weereens is die inhoud van die buis deeglik vermeng en die lae is toegelaat om te skei. 'n Oranje of ligpienk kleur in die boonste fase dui op normale vlakke van urobilinogeen in die uriene, maar 'n kersiepienk kleur in die boonste fase dui op abnormaal verhoogde vlakke urobilinogeen in die uriene. Verhoogde vlakke van porfobilinogeen in 'n pasiënt se uriene word aangedui deur 'n kersiepienk kleur in die onderste fase.

4.2.2 (e) Toets vir verhoogde hemoglobien of mioglobien

Hierdie siftingstoets is uitgevoer volgens die metode van Tietz (1970). Gelyke hoeveelhede drie % waterstofperoksied (v/v) en 'n versadigde oplossing van o-tolidien (1.08 g opgelos in absolute metanol en opgemaak tot 100 ml met gedistilleerde water) is vermeng. 'n Paar ml uriene is geplaas in 'n proefbuis. 'n Ooreenstemmende hoeveelheid vermengde reagent is by die uriene gevoeg en die inhoud van die buis is deeglik vermeng. 'n Blou kleur ontstaan indien verhoogde vlakke van hemoglobien of mioglobien in die uriene teenwoordig is. Die o-tolidien toets is uitgevoer op 'n urienemonster wat

geneem is op 'n dag dat die speeksel en uriene van die pasiënt verdonker het.

4.2.2 (f) Toets vir vrye porfiriene

Hierdie siftingstoets is uitgevoer volgens die metode beskryf deur Bishop *et al.* (1985). By twee ml uriene in 'n proefbuis is 1.5 ml van 'n mengsel van amielalkohol, eter en asynsuur (verhouding van 1:1:1, v/v) gevoeg. Die inhoud van die buis is goed vermeng en die buis is by 'n UV-lig gehou. 'n Pienk fluoressensie dui op positiewe porfirie.

4.2.2 (g) Toets vir homogentisiensuur

Die Benedict toets (Gray, 1974) is uitgevoer op sommige van die urienemonsters van die pasiënt om vas te stel of 'n verhoogde vlak van homogentisiensuur in die uriene van die pasiënt voorkom. Die Benedict reagens is opgemaak deur 173 g natriumsitraat en 100 g natriumkarbonaat op te los in 800 ml warm gedistilleerde water. Die oplossing is gefiltreer tot in 'n 1000 ml maatsilinder en die volume van die filtraat is opgemaak tot 850 ml met gedistilleerde water. Verder is 17.3 g kopersulfaat opgelos in 100 ml water en die volume is opgemaak tot 150 ml. Die eerste oplossing van natriumsitraat en natriumkarbonaat is gegiet in 'n tweede beker en die oplossing is geroer terwyl die kopersulfaatoplossing stadig bygevoeg is.

Vyf druppels uriene is gevoeg by twee ml Benedict reagens en die oplossing is geplaas in 'n kokende waterbad vir vyf minute. As positiewe kontrole is dié toets uitgevoer op die uriene van 'n pasiënt met alkaptonurie. 'n Verkleuring van die helderblou Benedict oplossing na 'n modderbruin oplossing en die vorming van 'n geel-oranje presipitaat dui op 'n positiewe toets vir 'n verhoogde vlak van homogentisiensuur in die uriene (La Du, 1983).

4.2.2 (h) Die ysterchloried toets

Hierdie siftingstoets is uitgevoer volgens die metode beskryf deur Gray (1974). Verhoogde vlakke van verskeie verbindings, onder andere homogentisiensuur, bilirubien, asetoasetaat, α -ketobutiraat en salisilate in uriene kan aangetoon word deur die ysterchloried toets. Drie druppels ferrichloried (tien g in 100 ml water) is gevoeg by een ml uriene in 'n proefbuis. Die buis is goed vermeng en die kleur van die oplossing is onmiddelik waargeneem en weer na tien minute.

'n Verbygaande blou-groen kleur kan onder andere veroorsaak word deur verhoogde vlakke van homogentisiensuur in die uriene. 'n Verhoogde vlak van bilirubien of fenielketonurie metaboliëte in die uriene lewer 'n blou-groen kleur met die ysterchloried toets.

4.2.2 (i) Toets vir verhoogde indoksielsulfaat (indikan)

Hierdie siftingstoets is uitgevoer volgens die metode van Obermayer (Kaplan & Pesce, 1989). Twee ml uriene is in 'n proefbuis geplaas en twee ml Obermayer se reagens (twee g ferrichloried opgelos in 1000 ml gekonsentreerde HCl) asook een ml chloroform is daarby gevoeg. Die inhoud van die buis is deeglik vermeng, en die chloroform is toegelaat om af te sak na die onderste gedeelte van die buis. Indien 'n verhoogde hoeveelheid indoksielsulfaat in die uriene teenwoordig is sal die chloroform laag 'n indigo blou kleur verkry.

4.2.3 Die bepaling van die kreatinienwaarde van urienemonsters

Die kreatinienwaarde van urienemonsters is bepaal volgens die metode van Vasiliades (1976) met behulp van die Technicon RA 100 instrument.

4.2.4 Organiese suur analise

Die volgende prosedure is gevolg vir organiese suur analyses: Een ml uriene is met 'n vyf M soutsuuroplossing tot pH een aangesuur. As interne standaard is 3-fenielbottersuur bygevoeg tot 'n konsentrasie van 626.5 mg/g kreatinien. Die volume interne standaard wat by elke monster gevoeg is, is as volg bereken:

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

Ses ml koue etielasetaat is by die uriene gevoeg en vir ongeveer 'n halfuur in 'n skudmasjien geëkstraheer. Na sentrifugering is die etielasetaatfase na 'n ander buis oorgedra. Die oorblywende waterfase is daarna vir tien minute met drie ml koue diëtleter geëkstraheer. Na sentrifugering is die diëtleter afgetrek en met die etielasetaatfase gekombineer. Die gekombineerde organiese fases is met ongeveer drie spatelpunte natriumsulfaat gedroog, waarna die ontwaterde fases versigtig onder stikstof afgedamp is. Die gedroogde residu is gederivatiseer vir GC-MS analise met BSTFA (N,O-bis(trimetiel-silil)trifluoroasetamied) en TMCS (Trimetielchlorosilaan) (5:1,v/v) by 60°C vir 60 min.

'n Hoeveelheid van 0.4 μl van die gederivatiseerde materiaal is op 'n Hewlett Packard 5880A-gaschromatograaf geanaliseer. Skeiding van komponente in die monster het op 'n Permabond SE 30-DF-0.25-kolom, waarvan die lengte 25 m en die interne deursnee 0.32 mm was, plaasgevind. Stikstof, wat as draergas opgetree het, het teen 'n tempo van een ml per minuut deur die kolom beweeg en deteksie is met behulp van 'n vlamionisasiedetektor by

260°C gedoen. 'n Liniêre temperatuurgradiënt vanaf 70 tot 270°C, teen 'n tempo van vyf °C per minuut, is vir die skeiding van organiese komponente

aangewend. Die data is met behulp van 'n Spectra-Physics-integreerder (SP 4290) verwerk.

Om die konsentrasies van organiese komponente in die monster te bereken, is die volgende formule gebruik:

$$[B] = \text{area B} / \text{area I.S.} \times [\text{I.S.}]$$

waar [B] = konsentrasie van organiese suur in mg/g kreatinien

area B = area onder die gaschromatografiese piek van die organiese suur

area I.S. = area onder die gaschromatografiese piek van die interne standaard

[I.S.] = konsentrasie van die interne standaard, naamlik 626.5 mg/g kreatinien.

Om die berekende konsentrasies aan te pas tot die mmol/mol kreatinien eenheid is die volgende formule gebruik:

[B] in mmol/mol kreatinien =

[B] in mg/g kreatinien \times 113.1/molekulêre massa van organiese suur B

GC-MS analise is ook aangewend om die identifikasie van verbindings in die monsters te vergemaklik. Die komponente in elk van die monsters is op 'n Hewlett-Packard 5890 series II-gaschromatograaf geskei. 'n Permabond-kolom, waarvan die lengte 25 m en die interne deursnee 0.32 mm was, is deurgaans gebruik. Helium het as draergas opgetree en 'n liniêre temperatuurprogram vanaf 60°C tot 280°C, teen 'n tempo van 5°C/min., is gebruik. Die gaschromatograaf was aan 'n Hewlett-Packard 5988A-kwadropoolmassaspektrometer gekoppel en aftasting is vanaf 70 tot 550 massa-eenhede, met 70 eV ionisasiepotensiaal en 'n brontemperatuur van 200°C, gedoen.

4.2.5 Die kwantifisering van urinêre aminosure deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie

Tien μl uriene is gevoeg in 'n polipropileen eppendorf buis. Hierna is 400 μl van 'n aminosuurstandaardmengsel (200 maal verdun vanaf die oorspronklike) bygevoeg. Die oorspronklike, onverdunde aminosuurstandaardoplossing het bestaan uit 'n mengsel van deuteriumgemerkte aminosure in spesifieke konsentrasies. Die mengsel is by 50°C onder 'n stroom van stikstofgas gedroog. Hierna is die gedroogde monster gebutieleer deur 200 μl drie N butanoliese HCl daarby te voeg en dit 15 minute by 70°C te verhit. Die gebutieleerde verbindings is hierna by 50°C onder 'n stroom van stikstofgas gedroog. Die gedroogde gebutieleerde verbindings is opgelos in 100 μl van 'n 1:1 (v/v) mengsel van asetoniëtriel en water wat een % mieresuur bevat het. Tien μl van die oplossing is gespuit in die elektrospoei-inlaat van 'n VG Quattro 2 drieledige kwadruupool massaspektrometer (Micromass). Die werking van die instrument is volledig beskryf deur Nolte (1997). Die massaspektrometriese analise van gebutieleerde aminosure is uitgevoer volgens die beginsel van moederioonskandering. Moederioonskandering is 'n wyse waarvolgens data versamel kan word tydens tandem massaspektrometrie (MS-MS). Moederioonskandering is veral geskik vir die waarneming van 'n bekende groep verbindings wat 'n gemeenskaplike dogterioon lewer tydens fragmentasie, hoewel die verbindings verskillende moederione kan hê.

Die spanning oor die elektrospoei kapillêr was 3.5 kV, die keëlspanning was 30 V en die temperatuur van die bron was 60°C. Stikstof is gebruik as drogings- en nebuliseringsgas en die vloeitempo van die drogings- en nebuliseringsgas was 350 L/h en 20 L/h onderskeidelik. Botsingsgeïnduseerde dissosiasie (CID) met argongas in die botsingsel by 'n

druk van 8.9×10^{-4} mbar het gelei tot die neutrale verlies van 'n massa van 102 by gebutieleerde aminosure.

By 'n botsingsenergie van 25 eV is ook geskandeer vir die neutrale verlies van 119 by sekere aminosure. Die eerste massaspektrometer skandeer oor 'n massagebied wat die massas van al die moederione insluit. Elke keer as 'n ioon deurbeweeg wat in die botsingsel fragmenteer om die karakteristieke verlies van 102 of 119 te lewer, is dit in die eerste MS waargeneem. Die massaspektrum wat sodoende in massaspektrometer een ontstaan het was dié van die moederione wat 'n neutrale massaverlies van 102 of 119 gelewer het. Aminosure is gekwantifiseer relatief tot die deuteriumgemerkte interne standaardaminosure.

4.2.6 Sintese en suiwing van 'n indoliese melanien metaboliet

4.2.6 (a) Sintese van 6H5MI2K

Die sintese van 6H5MI2K is uitgevoer volgens die metode beskryf deur Hansson (1988). 6-Bensieloksi-5-metoksi-indool-2-karboksielsuur (100 mg) is gehidrogeneer in 'n mengsel van etielasetaat (30 ml) en ysasynsuur (15ml) en palladium (tien % op koolstof, 30 mg) is bygevoeg as katalis. Met heftige vermenging by atmosferiese druk en kamertemperatuur is gehidrogeneer totdat dunlaagchromatografie aangetoon het dat die reaksie voltooi was. Die katalis is afgefiltreer en die oplosmiddel is afgedamp deur middel van 'n Rotavapor RE 120 instrument totdat 'n droë poeier verkry is. Die residu is geanaliseer deur middel van elektonimpak-massaspektrometrie.

4.2.6(b) Bevestiging van die identiteit van die gesintetiseerde 6H5MI2K

Die produk van die sintese na afdamping was 'n donkerbruin poeier. 'n Spatelpunt daarvan is geplaas in 'n proefbuis en nege ml etielasetaat is daarby gevoeg. Die buis is verseël en deeglik geskud. Dit was duidelik dat die filtreringstap nie al die katalis verwyder het nie. Die buis is gelaat sodat die swaarder partikels van die katalis kon presipiteer. Agt ml van die supernatant is onder 'n stroom van stikstofgas afgedamp tot droog om 'n wit poeier te verkry. Die monster is daarna gederivatiseer met 100 μ l BSTFA en 20 μ l TMCS vir 60 minute by 60°C. GC-MS analise is uitgevoer op 'n Hewlett-Packard 5988A massaspektometer toegerus met 'n Hewlett-Packard 5980 GC en 'n SE 30 (25 x 0,32 mm ID) kapillêre kolom en 0.6 μ l van die gederivatiseerde verbinding is gespuit. 'n Heliumvloei van een ml/min is gebruik en gedurende die analise is die temperatuur geprogrammeer van 60°C tot 120°C teen vier °C/min en dan tot 280°C teen tien °C/min. 'n Ionisasie-energie van 70 eV is gebruik.

4.2.7 Die sintese en suiwing van die fenoliese melaniënverwante metaboliet 5SSD

4.2.7 (a) Sintese van 5SSD.

Die ensiematiese sintese van 5SSD is uitgevoer volgens die metode beskryf deur Ito & Prota (1977). 'n Oplossing van L-DOPA (5.5 mg) en L-sisteïen (6.72 mg) in 0.05 M natriumfosfaatbuffer, pH 6.8 (3.3 ml) is geskud by 22°C in die teenwoordigheid van sampioen tirosinase (een mg, 4400 eenhede/mg). Die reaksie is gevolg deur die UV spektrum (in 0.1 M HCl) elke tien minute te monitor deur middel van 'n Beckman DU 7500 spektrofotometer. Na ongeveer 45 minute is die oorspronklike

absorpsiemaksimum van L-DOPA by 280 nm heeltemal vervang deur nuwe maksima by 255 en 293 nm, die absorpsiemaksima van 5SSD (Ito & Prota, 1977). Die oksidasie is gestop deur die reaksiemengsel aan te suur na pH een met ses M HCl.

4.2.7(b) Suiwering en bevestiging van die identiteit van die gesintetiseerde 5SSD.

Die suiwering van die gesintetiseerde verbinding is uitgevoer volgens 'n gewysigde metode van Agrup *et al.* (1983). Die reaksiemengsel het verskeie verbindings, onder andere L-DOPA, 5SSD, 2-S-sisteïenioldopa, 6-S-sisteïenioldopa en 2,5-S,S-disisteïenioldopa, bevat. Daar is gebruik gemaak van 'n Beckman System Gold HPLC sisteem om 5SSD te suiwer van bogenoemde verbindings en die ander komponente van die reaksiemengsel. Honderd μl van die reaksiemengsel is gefiltreer deur 'n 0.2 μm Millipore filtertjie, en 20 μl daarvan is gespuit op 'n C_{18} omgekeerde fase kolom (Beckman Ultraspere ODS, deeltjiegrootte vyf μm , 150 x 4.6 mm) toegerus met 'n 20 μl inspuitingslus. Die mobiele fase wat gebruik is vir die skeiding het bestaan uit tien g/l fosforsuur en sewe g/l metaansulfoonsuur in dubbel gedistilleerde water. Die pH van die loopmiddel is ingestel tot 2.35 met 5 M natriumhidroksied. Die vloeitempo van die loopmiddel was 1.2 ml/min en die skeiding is gemonitor met 'n Beckman System Gold diode array detektor by 290 en 280 nm. Die hoof piek, wat 14 minute na inspuiting verskyn het, is gefraksioneer en die versamelde fraksies van hierdie verbinding is gevriesdroog. Hierdie gevriesdroogde preparaat is opgelos in 'n mengsel van water en asetonitriël (1:1, v/v) wat een % mieresuur bevat het. Tien μl van hierdie oplossing is ingespuit in 'n VG Quattro 2 massaspektrometer. Daar is gebruik gemaak van atmosferiese druk chemiese ionisasie om die verbinding te ioniseer. Daar is gepoog om te bevestig dat die gesintetiseerde, gesuiwerde verbinding wel die molekulêre massa van 5SSD het.

Die gesintetiseerde 5SSD is ook geanaliseer deur middel van elektrosproei-massaspektrometrie. Die spanning oor die elektrosproei kapillêr was 3.5 kV, die keëlspanning was 32 V en die temperatuur van die bron was 70°C. Die vloeitempo van die drogings- en nebuliseringsgas, stikstof, was 350 L/h en 20 L/h onderskeidelik. Die druk in die botsingsel was 1.3×10^{-3} mbar en die botsingsenergie was 12 eV.

4.2.8 Die kwantifisering van 5SSD, L-DOPA en DA deur middel van HPLC met elektrochemiese deteksie

Vorbereiding van urienemonsters vir die kwantifisering van 5SSD, L-DOPA en DA is uitgevoer volgens die metode van Ito *et al.* (1984). Bogenoemde verbindinge is as volg uit die uriene geëkstraheer: In 'n koniese plastiese buis (1.5 ml volume) is 50 mg suur-gewasde aluminiumoksied geplaas, asook 100 µl twee % (m/v) natriummetabisulfitoplossing en tien µl van die interne standaard oplossing, wat bestaan het uit tien µg/ml α -metioldopa opgelos in 0.1 M HCl. Hierby is 100 µl uriene gevoeg asook 100 µl 0.1 M HCl oplossing. Dit is twee maal geëkstraheer met een ml etielasetaat deur dit vir twee minute te skud. Om die verbindinge te laat adsorbeer aan alumina is een ml 1.5 M Tris-HCl buffer, wat twee % (m/v) Na₂EDTA (pH 8.6) bevat, bygevoeg. Die oplossing is onmiddelik geskud vir vyf minute, waarna dit gesentrifugeer is. Na sentrifugering is die alumina twee maal gewas met 1.5 ml gedistilleerde water. Die verbindinge is geëlueer vanaf die alumina met 200 µl 0.4 M perchloorsuur deur dit vir twee minute te skud. Na sentrifugering is die supernatant gefiltreer deur 'n 0.2 µm millipore filter en 50-100 µl van die filtraat is gespuit op die HPLC-kolom. Die verbindinge kon gekwantifiseer word deur hul piekareas te vergelyk met dié van α -metioldopa.

'n Bioanalytical Systems LC-22A vloeistofchromatograaf is gebruik met 'n Waters 510 HPLC pomp, 'n Waters 460 elektrochemiese detektor en 'n

Spectra-Physics SP4290 integreerder. Die detektor is gestel op +750 mV teenoor 'n Ag/AgCl (silwer/silwerchloried) verwysingselektrode. Daar is gepoog om verbindings te skei deur middel van 'n C₁₈ omgekeerde fase kolom (Beckman Ultrasphere ODS, deeltjie-grootte vyf µm, 4.6 x 150 mm) by 35°C. Die mobiele fase het tien g/l fosforsuur en sewe g/l metaansulfoonsuur bevat in dubbel gedistilleerde water. Die pH van die mobiele fase is ingestel tot 2.35 met vyf

M natriumhidroksied. Hierby is Na₂EDTA tot 'n finale konsentrasie van 0.1 mM/l gevoeg. Die mobiele fase is voor gebruik gefiltreer deur 'n 0.2 µm filter en is ontgas deur dit te plaas in 'n soniseerapparaat. Die vloeitempo van die mobiele fase is ingestel op een ml/min.

4.2.9 Die kwantifisering van melaniënverwante metaboliete in uriene deur middel van elektrospoei massaspektrometrie

4.2.9(a) Die vasstel van die optimale kondisies vir ES-MS analise van L-DOPA, DA, OMD, α-metiöldopa en 5SSD

Standaarde van L-DOPA, DA, α-metiöldopa en OMD is aangekoop van Sigma. 'n Paar fyn kristalle van L-DOPA is opgelos in 'n oplossing van een% mieresuur in 'n mengsel van water en asetonitriël (1:1 verhouding v/v) en tien µl is gespuit in die elektrospoei-inlaat van 'n VG Quattro 2 kwadropool massaspektrometer. Die spanning oor die elektrospoei kapillêr was 3.5 kV en die temperatuur van die bron was 120°C. Die vloeitempo van die drogings- en nebuliseringsgas (stikstof) was 350 L/h en 20 L/h onderskeidelik. Botsingsgeïnduseerde dissosiasie (CID) met argongas in die botsingsel is uitgevoer by 'n druk van 1.3×10^{-3} mbar. Deur die keëlspanning en botsingsenergie geleidelik te wysig kon vasgestel word by watter waardes van hierdie twee parameters L-DOPA duidelike dogterione gelewer het na fragmentasie. Dieselfde analise is ook uitgevoer met elkeen van die bogenoemde standarde ten einde vas te stel by watter

massaspektrometriese kondisies elk van die verbindings die beste waargeneem kon word.

Deur bogenoemde analyses is vasgestel dat die geanaliseerde verbindings die beste waargeneem is by die kondisies getoon in tabel 4.1.

Tabel 4.1 : Massaspektrometriese kondisies vir die waarneming van L-DOPA, DA, OMD, α -metioldopa en 5SSD.

Verbinding	Keëlspanning (V)	Botsingsenergie (eV)
L-DOPA	15	9
DA	15	12
OMD	15	15
α -Metioldopa	15	15
5-SSD	32	12

4.2.9(b) Die ekstraksie van L-DOPA, DA, OMD en 5SSD uit uriene deur middel van aluminiumoksied

Die ekstraksiemetode beskryf deur Anderson (1988) is aangewend om L-DOPA, DA, sisteïnioldopa en OMD uit uriene te ekstraheer.

Suurgewaste aluminiumoksied (alumina) is aangekoop van SMM instrumente en is voor gebruik vir vier ure gedroog in 'n oond by 200°C. Een honderd mg alumina is geplaas in 'n proefbuis met 'n skroefdop wat dig seël. Hierby is 400 μ l van vyf % (m/v) natriummetabisulfiet gevoeg asook twee ml uriene en 200 ng van die interne standaard α -metioldopa. Hierby is vier ml drie M Tris buffer (pH 8.6) gevoeg. Die buise is dadelik gesluit en by kamertemperatuur geskud vir tien minute. Die supernatant is afgetrek en die alumina is twee maal gewas met vier ml dubbel gedistilleerde water, waarvan die pH vooraf ingestel is tot 6.0. Nadat soveel as moontlik van die tweede was verwyder is,

is die verbindingsgeëluëer vanaf die alumina met vier ml een M asynsuur (Anderson, 1988) of vier ml 0.1 M HCl. Die eluaat is gevriesdroog. Hierdie verbindingsgeëluëer kon ook vanaf die alumina geëluëer word deur middel van vier ml 0.4 N asynsuur in metanol (Mizuno, 1977) of 4 ml 0.4 N mieresuur in etanol (Mizuno, 1977). Die organiese oplosmiddel eluate is gedroog onder 'n stroom van stikstofgas. Die gedroogde verbindingsgeëluëer is opgelos in 100 µl van 'n water en asetonitriël mengsel (1:1,v/v) wat een % mieresuur bevat het en tien µl is gespuit in die elektrospoei-inlaat van 'n VG Quattro 2 kwadruupool

massaspektrometer. Die optimale kondisies vir ES-MS analise soos bepaal onder punt 4.2.9 (a) is gebruik vir die kwantifisering van L-DOPA, DA, OMD en 5-SSD in die uriene van die pasiënt.

4.2.9(c) Die kwantifisering van L-DOPA, DA, OMD en 5SSD na alumina ekstraksie

Die gedroogde ekstrakte voorberei soos beskryf onder punt 4.2.9 (b) is opgelos in 100 µl van 'n 1:1 mengsel van dubbel gedistilleerde water en asetonitriël wat een % mieresuur bevat het. Tien µl van die oplossing is gespuit in die elektrospoei-inlaat van 'n VG Quattro 2 elektrospoei massaspektrometer. Die optimale ES-MS kondisies vir elkeen van die verbindingsgeëluëer soos bepaal onder punt 4.2.9 (a) is gebruik vir die kwantifisering van L-DOPA, DA, OMD en 5SSD in die uriene.

Aangesien die konsentrasie van 5SSD in oplossing na die suiwering van die verbindingsgeëluëer nie bekend was nie, is daar nie 'n standaardkurwe vir 5SSD getrek nie. Standaardreeks is opgestel vir L-DOPA, DA en OMD. Die konsentrasies van L-DOPA, DA en OMD by die punte in die standaardreeks is so gekies dat dit konsentrasies ingesluit het binne die konsentrasiegebied wat voorkom in kontrole-uriene asook die uriene van

pasiënte wat met Sinemet behandel word. Die konsentrasie van die interne standaard, α -metioldopa, by elke punt van die standaardreeks was 1774 ng/ml. Die konsentrasiereeks van L-DOPA en OMD het as volg daaruit gesien: 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 en 8000 ng/ml. Die konsentrasiereeks van DA het as volg daaruit gesien: 8.1, 16.2, 40.5, 81, 162, 405, 810, 1620, 4050 en 6480 ng/ml. Hierdie standaardreeks is opgemaak in 'n mengsel van water en asetonitriël (1:1, v/v) wat een % miersuur bevat het, en tien μ l is gespuit in die elektrospoei-inlaat van die VG Quattro 2 massaspektrometer. Die optimale ES-MS kondisies soos bepaal onder punt 4.2.9 (a) is gebruik vir die kwantifisering van L-DOPA, DA en OMD. Data is versamel volgens die beginsel van meervoudige reaksie monitering. Die areas van die pieke van L-DOPA, DA, OMD en α -metioldopa by elke punt in die konsentrasiereeks is aangewend om 'n standaardkurwe vir L-DOPA, DA en OMD te trek. Die y-koördinaat by elke punt in die standaardkurwe het bestaan uit die verhouding: area Z/area interne standaard waar z L-DOPA, DA of OMD voorstel. Die x-koördinaat by elke punt in die standaardkurwe het bestaan uit die verhouding: konsentrasie z/konsentrasie interne standaard. Die standaardkurwe het bestaan uit die beste reguitlyn deur die standaardpunte. Die vergelyking van die reguitlyn standaardkurwe in die vorm $y = mx + c$ is bepaal.

Die konsentrasie van L-DOPA, DA en OMD is dan volgens die volgende vergelyking bereken:

$$\text{konsentrasie } z = [(y-c)/m][\text{konsentrasie van die interne standaard in die uriene monster}]$$

$$\text{konsentrasie } z = [(y-c)/m][177.4 \text{ ng/ml}]$$

waar z = L-DOPA of DA of OMD

y = area z/area interne standaard

c = die y-afsnit van die standaardkurwe

m = die gradiënt van die reglynige standaardkurwe

Die konsentrasie van z in urienemonsters is aangepas om die kreatinienwaarde van urienemonsters in μg te neem volgens die volgende formule:

$[z]$ in mol/mmol kreatinien =

$\{[z] \text{ in ng/ml} \times 1000 \div \text{kreatinienwaarde in mmol/l}\} \div \text{molekulêre massa van } z\}$

Waar $[z]$ = Konsentrasie van z

4.2.9(d) Die kwantifisering van DA, L-DOPA en OMD deur middel van elektrosproei-massaspektrometrie na derivatisering met butanoliese HCl

Tien μl uriene is gevoeg in 'n polipropileen eppendorf buis. Hierby is 400 μl van 'n 0.9 $\mu\text{g/ml}$ D_{10} -isoleusien oplossing gevoeg. Die mengsel is by 50°C in 'n vakuumond gedroog. Die gedroogde monster is gebutieleer deur 200 μl drie N butanoliese HCl daarby te voeg en dit 15 minute by 70°C te verhit. Die gebutieleerde verbindings is hierna by 50°C in 'n vakuumond gedroog. Die gedroogde gebutieleerde verbindings is opgelos in 100 μl van 'n 1:1 (v/v) mengsel van asetonitriël en water wat een % mieresuur bevat het. Tien μl van die opgeloste verbindings is gespuit in die elektrosproei-inlaat van die VG Quattro 2 massaspektrometer. Die spanning oor die elektrosproei kapillêr was 3.5 kV en die temperatuur van die bron was 60°C. Die vloeitempo van stikstof, die drogings- en nebuliseringsgas, was 350 L/h en 20 L/h onderskeidelik. Die druk in die botsingsel was 3.0×10^{-3} mbar.

Die konsentrasie van DA, L-DOPA en OMD in urienemonsters is bepaal deur die area van die DA, L-DOPA of OMD piek en die interne standaard (D_{10} -isoleusien) piek te vervang in die vergelyking van die reglynige standaardkurwes van DA, L-DOPA en OMD. Die x en y koördinate by elke punt op die standaardkurwe het bestaan uit dieselfde verhoudings beskryf onder punt 4.2.9(c). Die volgende vergelyking is dus telkens gebruik om die konsentrasie L-DOPA of OMD in elk van die urienemonsters van die pasiënt te bereken:

konsentrasie $z = [(y-c)/m][\text{konsentrasie interne standaard bygevoeg in die urienemonster}]$

$z = \text{L-DOPA of OMD}$

$y = \text{area van L-DOPA of OMD piek / area interne standaard piek}$

$c = \text{Die y-afsnit van die reglynige standaardkurwe}$

$m = \text{Die gradiënt van die reglynige standaardkurwe}$

Die konsentrasie van z in elke monster is aangepas om die kreatinienwaarde van elke urienemonster in ag te neem volgens formules uiteengesit onder punt 4.2.9(c).

Die standaardkonsentrasiereekse vir die opstel van standaardkurwes vir L-DOPA en OMD het as volg daaruit gesien: 5, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000, 5000, 10000 en 20000 ng/ml. Die standaardkonsentrasiereeks van DA het as volg daaruit gesien: 4.05, 20.25, 40.5, 81, 202.5, 405, 607.5, 810, 1620, 4050, 8100 en 16200 ng/ml. Hierdie konsentrasiereekse is opgemaak in 0.1 M HCl. Die konsentrasie van die interne standaard by elke punt in die standaardkurwe was 36 ng/ml. Tien

μl van elk van die standaardreekskonsentrasies is gedroog, gebutieleer en geanaliseer soos beskryf is vir urienemonsters.

Aangesien DA en 6H5MI2K nie gebutieleer het nie is daar geskandeer vir hierdie verbindings op grond van hul moeder en dogterione. Tabel 4.2 toon die ione waarvoor geskandeer is asook die massaspektrometriese kondisies waarby geskandeer is vir DA en 6H5MI2K.

Tabel 4.2 : Massaspektrometriese skandering vir DA en 6H5MI2K

Verbinding	Moederoon	Dogterioon	Keëlspanning (V)	Botsingsenergie (eV)
DA	154	136.9	24	25
6H5MI2K	208	161.9	30	12

L-DOPA, OMD, 5SSD en die interne standaard, D₁₀-isoleusien, het wel gebutieleer en het 'n neutrale verlies van 102 getoon tydens massaspektrometrie. Data vir die kwantifisering van hierdie verbindings is

dus versamel volgens die beginsel van moederoonskandering. Daar is dus geskandeer vir die moederione van alle verbindings wat 'n neutrale verlies van 102 getoon het. Tabel 4.3 toon die massas van die moederione van die verbindings waarvoor geskandeer is asook die kondisies van massaspektrometriese analise.

Tabel 4.3 : Massaspektrometriese skandering vir L-DOPA, OMD, 5SSD en D₁₀-isoleusien

Verbinding	Moederoon (m/z)	Keëlspanning (V)	Botsingsenergie (eV)
L-DOPA	254	30	12
OMD	268	30	12
5SSD	373	30	22
D ₁₀ -isoleusien	198	30	12

4.2.9(e) Die kwantifisering van DA, 5SSD en 6H5MI2K in urienemonsters na derivatisering met butanoliese HCl by minder drastiese kondisies

Urienemonsters en die standaardkonsentrasies vir die opstel van die standaardkurwe van DA is voorberei soos beskryf is onder punt 4.2.9 (d) met die wysiging dat urienemonsters telkens by 30°C onder 'n stroom van stikstofgas gedroog is en butielering met butanoliese HCl uitgevoer is by 50°C in plaas van 70°C. Aangesien die konsentrasies van 5SSD en 6H5MI2K in oplossing na sintese en suiwing van hierdie verbindings nie bekend was nie, is standaardkurwes nie vir hierdie verbindings getrek nie.

4.2.10 Analise van die onbekende verbindings in die vlekke op die pasiënt se klere

4.2.10(a) Oplos van die onbekende verbindings in die vlekke op die pasiënt se klere

Daar is gepoog om die donkerbruin na swart verbindings uit die klere van die pasiënt te ekstraheer deur gebruik te maak van 'n verskeidenheid organiese oplosmiddels. Die volgende organiese oplosmiddels is probeer: piridien, anilien, aseton, dimetielsulfoksied, gliserol, metanol, etanol, diëtieleter, etielasetaat, benseen, butaan, chloroform, heksaan. Ook ander oplosmiddels soos water, ammoniak, mieresuur, verdunde natriumhidroksiedoplossing asook gekonsentreerde en verdunde HCl oplossing is probeer. 'n Klein stukkie gevlekte materiaal is telkens uit die gevlekte klere van die pasiënt geknip en geplaas in een van die bogenoemde oplosmiddels in 'n proefbuis. Die proefbuis is geskud en die lap is ondersoek vir enige tekens dat die swart verbindings oplos.

4.2.10(b) Die ekstraksie en gaschromatografiese analise van die onbekende verbindings uit die vlekke op die klere

Vier ml van 'n vier M NaOH (Natriumhidroksied) oplossing is gevoeg by 30 ml dubbel gedistilleerde water in 'n glasbeker sodat die oplossing 'n pH van 11 gehad het. Stukkies van die materiaal van die pasiënt se klere, waarop die donkerbruin en swart vlekke voorgekom het, is in die oplossing geplaas totdat die alkaliese oplossing vol stukkies lap was. Die oplossing met stukkies lap is vir 48 uur by kamertemperatuur gelaat, terwyl dit voortdurend deur middel van 'n magnetiese roerder geroer is. Die swart en donkerbruin vlekke op die lap het bykans heeltemal ontkleur tot 'n liggeel kleur en die alkaliese oplossing het 'n geelbruin kleur aangeneem. Die alkaliese ekstrak is aangesuur tot pH een met 99 % mieresuur en gevriesdroog. Ongevekte

gedeeltes van die pasiënt se klere is ook aan die alkaliese behandeling, aansuring en droging onderwerp.

Van die ongevekte materiaal van die pasiënt se klere is in klein blokkies geknip. Dertig mg L-DOPA of 65 mg DA (Sigma) is opgelos in 25 ml van 'n 0.05 M natriumfosfaatbuffer (pH 7.2). Die stukkies ongevekte lap is vir 48 uur hierin geïnkubeer terwyl die oplossing voortdurend geroer is. Die lap het na 48 uur inkubasie 'n donkerbruin na swart kleur gehad. Hierdie gevlekte stukkies is ook onderwerp aan bogenoemde alkaliese behandeling, aansuring en droging.

'n Spatelpunt van elk van die gedroogde alkaliese ekstrakte is opgelos in een ml dubbel gedistilleerde water en die waterige oplossing is onderwerp aan organiese oplosmiddelekstraksie soos beskryf onder punt 4.2.4. Die gedroogde residu is gederivatiseer vir GC-MS analise met BSTFA en TMCS (5:1, v/v) by 60°C vir 60 minute. Die gederivatiseerde materiaal is deur middel

van 'n Hewlett-Packard 5880A-gaschromatograaf geanaliseer soos beskryf onder punt 4.2.4.

4.2.10(c) Die analise van die onbekende verbindings deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie

Weereens is gevlekte materiaal van die pasiënt se klere onderwerp aan die alkaliese behandeling soos beskryf onder 4.2.10(b). Ook ongevlekte materiaal van die pasiënt se klere is so behandel. Materiaal is ook gelaat in L-DOPA en DA oplossings om dit te vlek soos beskryf onder 4.2.10(b) en dié sinteties gevlekte materiaal is ook onderwerp aan alkaliese behandeling.

Een ml van elk van die alkaliese ekstrakte is geplaas in 'n Kimax-buis en is aangesuur tot pH een deur middel van vyf M HCl. Hierby is tien μ l semikarbasied (1 M) gevoeg en 'n spatelpunt Na_2HCO_3 (Natriumbisulfit) is bygevoeg om die oplossing te versadig met Na_2HCO_3 . Vier ml etielasetaat en daarna 100 μ l propioniese anhidried is by die oplossing gevoeg en die mengsel is 30 minute geskud in 'n skudapparaat, waarna dit tien minute gesentrifugeer is by 40 omwentelinge per minuut. Die boonste etielasetaatfase is afgetrek en geplaas in 'n skoon buis. Vier ml etielasetaat is gevoeg by die onderste laag en die oplossing is weer vir 30 minute geskud waarna dit gesentrifugeer is. Die boonste etielasetaatfase is gekombineer met die eerste etielasetaat ekstrak en die gekombineerde etielasetaatfases is gedroog onder 'n stroom van stikstofgas. Die gedroogde ekstrakte is opgelos in 'n mengsel van water en asetonitriël (1:1,v/v) wat een % mieresuur bevat het, en is geanaliseer deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie. Tien μ l van die oplossing is gespuit in die elektrospoei-inlaat van die VG Quattro 2 massaspektrometer. Die spanning oor die elektrospoei kapillêr was 3.5 kV, die keëlspanning was 20 V en die temperatuur van die bron was 60°C. Die vloeitempo van die drogings- en nebuliseringsgas was soos

beskryf onder punt 4.2.5. Die druk in die botsingsel was 1.4×10^{-4} mbar. Daar is geskandeer oor 'n massagebied van 50 tot 2000 m/z.

HOOFSTUK 5

'N ULTRASTRUKTURELE ONDERSOEK VAN DIE HAARWORTEL MELANSIETE VAN DIE PASIËNT

5.1 INLEIDING

In die oorsig en kritiese beskouing van die kliniese geskiedenis van die pasiënt is melding gemaak van die feit dat die pasiënt heelwat eienskappe vertoon wat kenmerkend is van 'n rare en fatale vorm van okulokutaneuse albinisme, genaamd Chediak-Higashi sindroom. Veral die feit dat abnormale granules waargeneem is in die bloedselle van die pasiënt het die vermoede dat hierdie pasiënt Chediak-Higashi sindroom het versterk. Aangesien daar egter onsekerheid was of die abnormale granules in bloedselle wel die tipiese voorkoms het van kenmerkende granules wat voorkom by Chediak-Higashi sindroom, is besluit om te poog om hierdie voorlopige, twyfelagtige diagnose te bevestig. Abnormale granulering kom ook in ander seltepes behalwe die bloedselle van Chediak-Higashi sindroom pasiënte voor, onder andere die melanosiete (Perou & Kaplan, 1993; Zhao *et al.*, 1994). Deur die melanosiete van die pasiënt ultrastruktureel te ondersoek kon bevestig word of die pasiënt Chediak-Higashi sindroom het. Ook ander strukturele defekte van melanosiete, keratinosiete en melanosome, wat moontlik aanleiding kon gee tot die beeld van hipopigmentering by die pasiënt, kon deur middel van ultrastrukturele ondersoek opgespoor word.

Die haarwortel is gekies as bron van melanosiete aangesien dit maklik bekombaar is sonder om te veel ongerief aan die pasiënt te veroorsaak. Verder kom daar ook meer melanosiete per volume-eenheid in die haarwortel voor as in die vel (Boissy, 1988). Dit was egter belangrik om haarwortels wat in die anageen groeifase is te gebruik vir die maak van snitte deur die haarwortel, aangesien aktiewe melanogenese slegs plaasvind in anageen haarwortels (Boissy, 1988). Die verskillende strukture betrokke by

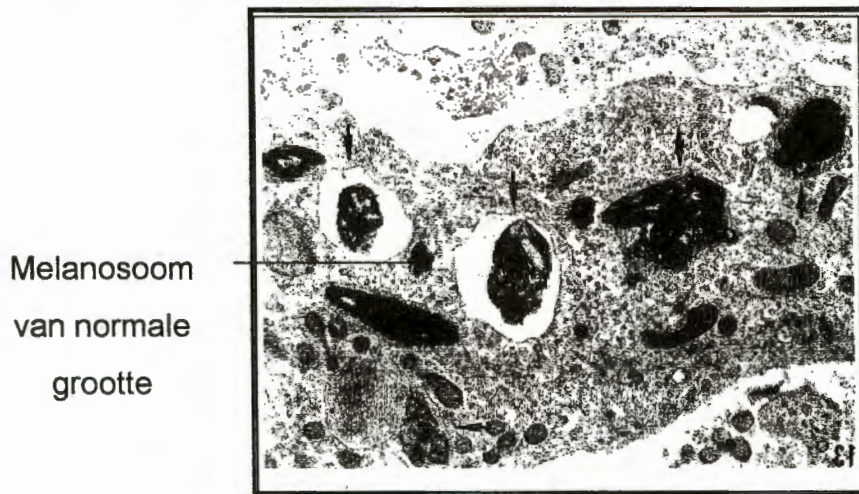
melanogenese sal dus die beste waarneembaar wees in anageen haarwortels.

In hierdie hoofstuk word die resultate van die ultrastrukturele ondersoek van die pasiënt se haarwortels weergegee. Die doel van die ondersoek was om vas te stel of die haarwortelmelanosiete en keratinosiete eienskappe vertoon wat kenmerkend is van Chediak-Higashi okulokutaneuse albinisme. Voordat die resultate van die ondersoek weergegee word, word eers 'n uiteensetting gegee van die ultrastrukturele kenmerke wat gewoonlik voorkom by die melanosiete en keratinosiete van Chediak-Higashi sindroom pasiënte.

5.2 DIE ULTRASTRUKTURELE KENMERKE VAN MELANOSIETE EN KERATINOSIETE BY CHEDIAK-HIGASHI SINDROOM ALBINISME

Die aantal en verspreiding van melanosiete in die liggame van Chediak-Higashi sindroom pasiënte is normaal (Ortonne *et al.*, 1983). Tirosinase aktiwiteit kom voor in die melanosiete en volledig ontwikkelde fase 4 melanosome kan waargeneem word in die melanosiete (Windhorst *et al.*, 1968; Witkop *et al.*, 1989). In die melanosiete van Chediak-Higashi sindroom pasiënte kom reuse melanosome (1.0-2.0 μm) voor en hierdie baie groot melanosome word moeilik oorgedra na die omringende keratinosiete (Zhao *et al.*, 1994). Dit lei dan tot die abnormale verspreiding van melanosome (Zhao *et al.*, 1994; King *et al.*, 1995). Gedurende die vroeë fases van melanosoom ontwikkeling is die melanosome reeds baie groot, en vanuit die voorkoms van die membrane van volwassewordende melanosome is dit duidelik dat kleiner melanosome ook met mekaar versmelt om al hoe groter melanosome te vorm (Ortonne *et al.*, 1983; Kinnear *et al.*, 1985). Baie van dié abnormale granules toon breekbaarheid van hul omringende membrane en ondergaan fragmentasie en degradering binne melanosiete en keratinosiete (Ortonne *et al.*, 1983; Witkop *et al.*, 1989).

Figuur 5.1 toon die tipiese voorkoms van die reuse melanosome in die melanosiete van persone met Chediak-Higashi sindroom.



Figuur 5.1 : Die voorkoms van die reuse melanosome in die melanosiete van persone met Chediak-Higashi sindroom (Witkop *et al.*, 1978).

Die groot pyltjies in figuur 5.1 toon die posisie van die reuse melanosome aan.

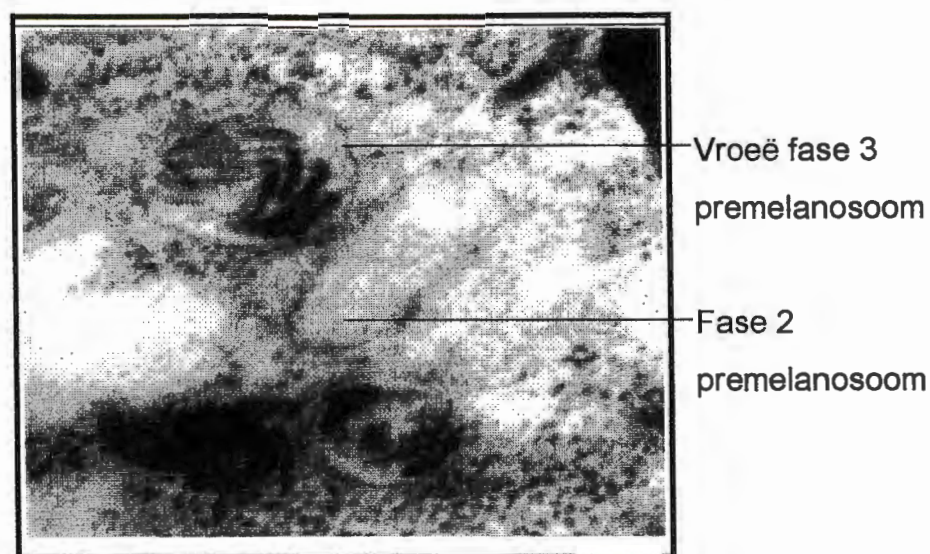
5.3 RESULTATE

5.3.1 Melanosome in korteks en medullêre selle van die hare van die pasiënt

Snitte van die haarwortel is voorberei soos beskryf onder punt 4.1.1 in hoofstuk 4 en die ondersoek van haarwortelmelanosiete en keratinosiete is uitgevoer soos beskryf is onder punt 4.1.2 in hoofstuk 4.

Die melanosiete in die haarwortels, wat nie in die L-DOPA oplossing geïnkubeer is nie, kon nie waargeneem word nie. Melanosome kon egter wel in die korteks en medullêre selle van die hare van die pasiënt waargeneem word. Figure 5.2 tot 5.4 toon sommige van die melanosome wat in die keratinosiete van die pasiënt waargeneem is. Hierdie figure is

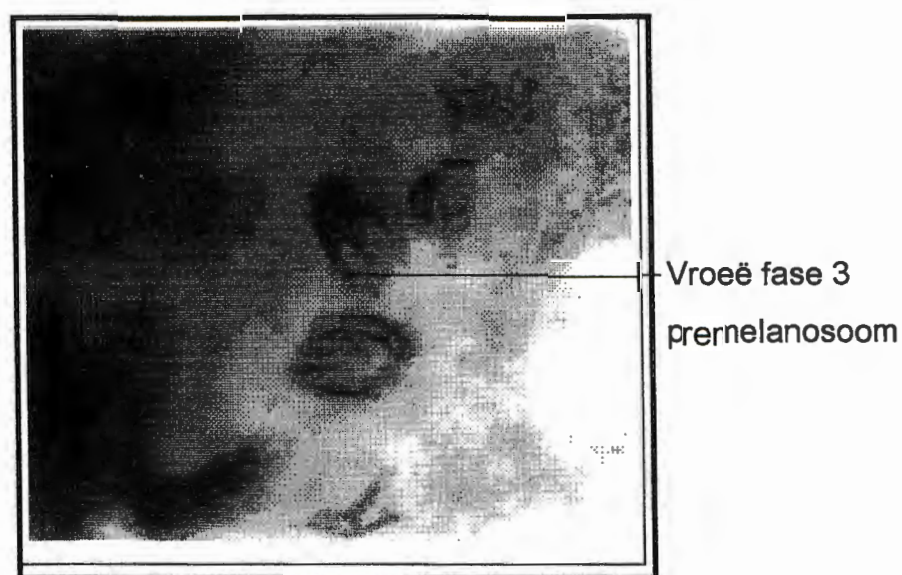
elektronmikrograwe gemaak van snitte deur haarwortels wat nie in L-DOPA geïnkubeer is nie.



Vergroting: 73000 x

0,5 μm _____

Figuur 5.2 : Fase 2 en vroeë fase 3 premelanosome



Vergroting: 68438 x

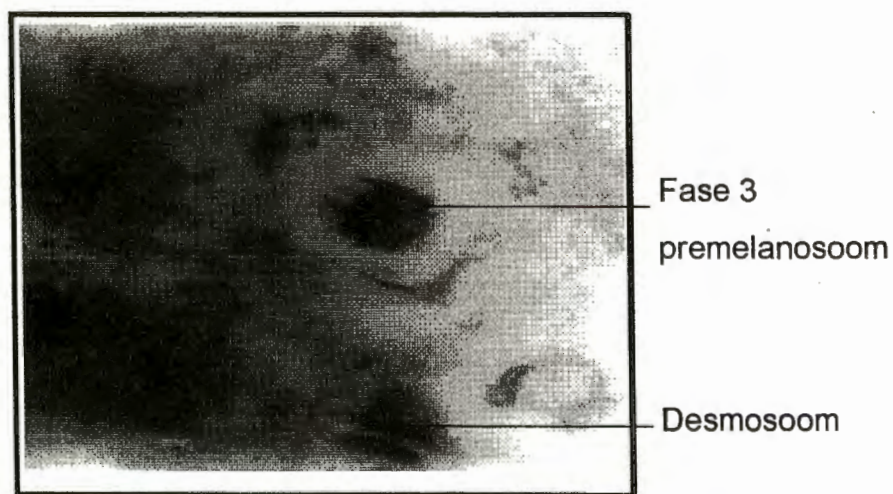
0.5 μm _____

Figuur 5.3: Vroeë fase 3 premelanosome.

In figuur 5.2 word premelanosome waarin 'n duidelike lamelstruktuur, waarop 'n geringe mate van pigment neergelê is, waargeneem. Hierdie

premelanosome kan dus geklassifiseer word as vroeë fase 3 eumelanosome. Ook 'n fase 2 premelanosoom is sigbaar in figuur 5.2 waarbinne 'n fyn lamelstruktuur, waarop geen melanien neergelê is nie, sigbaar is. Die grootte van die vroeë fase 3 premelanosoom aangedui in figuur 5.2 is $0.40 \times 0.27 \mu\text{m}$.

Die organelle getoon in figuur 5.3 bevat 'n duidelike, geordende lamelstruktuur waarop 'n mate van melanien neergelê is. Hierdie organelle kan dus geklassifiseer word as vroeë fase 3 eumelanosome. Die grootte van die vroeë fase 3 premelanosome aangedui in figuur 5.3 is $0.29 \times 0.16 \mu\text{m}$.



Vergroting: 73 000 x

0.5 μm

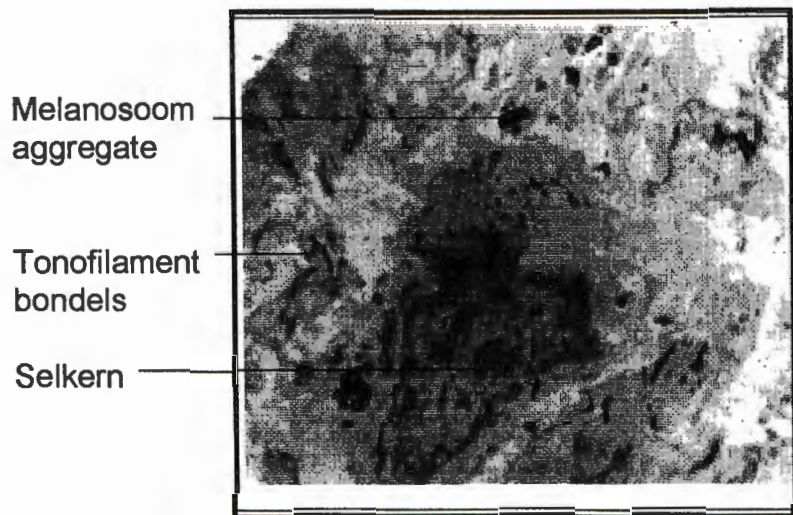
Figuur 5.4: Desmosoom en fase 3 premelanosoom

'n Desmosoom, wat gewoonlik voorkom in die selmembrane van keratonosiete maar nie melanosiete nie, is sigbaar in figuur 5.4. Die grootte van die fase 3 melanosoom in figuur 5.4 is $0.22 \times 0.15 \mu\text{m}$.

Geen volledig ontwikkelde fase 4 melanosome was sigbaar in die korteks en medullêre selle van die hare nie. Slegs fase 2 en vroeë fase 3 premelanosome is waargeneem. Geen abnormaliteite in die ultrastruktuur van melanosome en premelanosome is waargeneem nie. Die groottes van melanosome en premelanosome het gewissel van $0,22 \times 0,15 \mu\text{m}$ tot $0,40 \times$

0,27 μm . Die premelanosome wat waargeneem is het die voorkoms van eumelanosome gehad, aangesien die lamelle in dié organelle in 'n geordende rangskikking voorgekom het.

5.3.2 'n Kortekssel in 'n haarwortel van die pasiënt na L-DOPA inkubasie



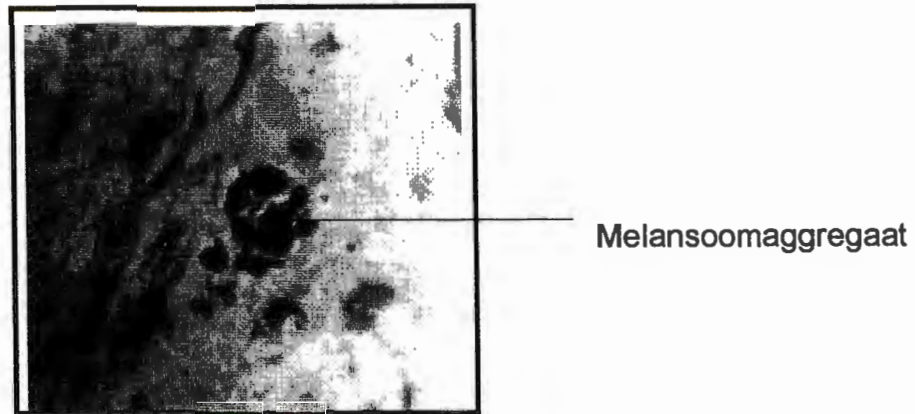
Vergroting: 6600x

5 μm

Figuur 5.5: Haarwortel kortekssel na L-DOPA inkubasie.

Hierdie sel toon die kenmerke van 'n keratinosiet, aangesien heelwat tonofilamentbondels sigbaar is in die sitoplasma en desmosome al langs die selmembraaan van die sel voorkom. Let op die saamgroepering van melanosome in die sitoplasma. Hierdie saamgroepering van melanosome is kenmerkend van die melanosome in die keratinosiete van blanke persone (Ortonne et al., 1983). Dit kom voor asof melanosome binne hierdie aggregate gedegradeer word. Heelwat fase 4 melanosome is sigbaar.

5.3.3 Melanosome in 'n kortekssel na L-DOPA inkubasie



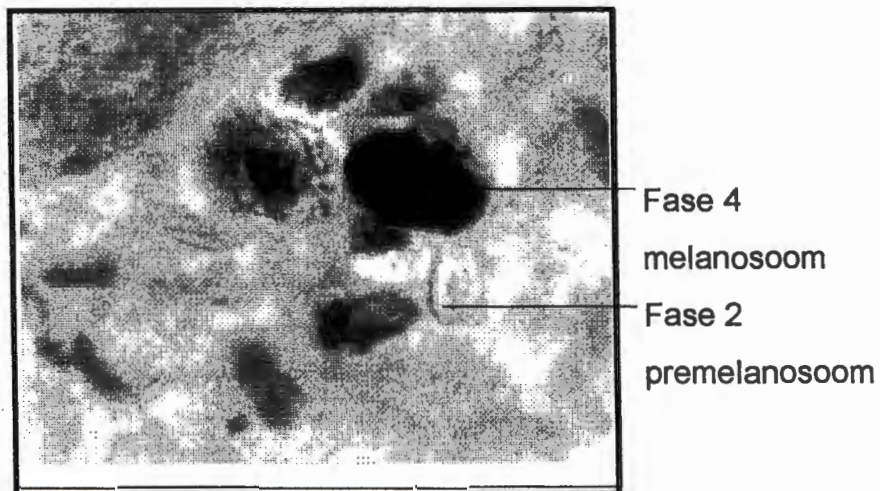
Vergroting: 15000x

2 μm _____

Figuur 5.6: Melansoomaggregaat van fase 4 melanosome.

'n Duidelike saamaggregasie van fase 4 melanosome is sigbaar in figuur 5.6.

Die grootte van die melanosome is: 0.33 x 0.26 μm .



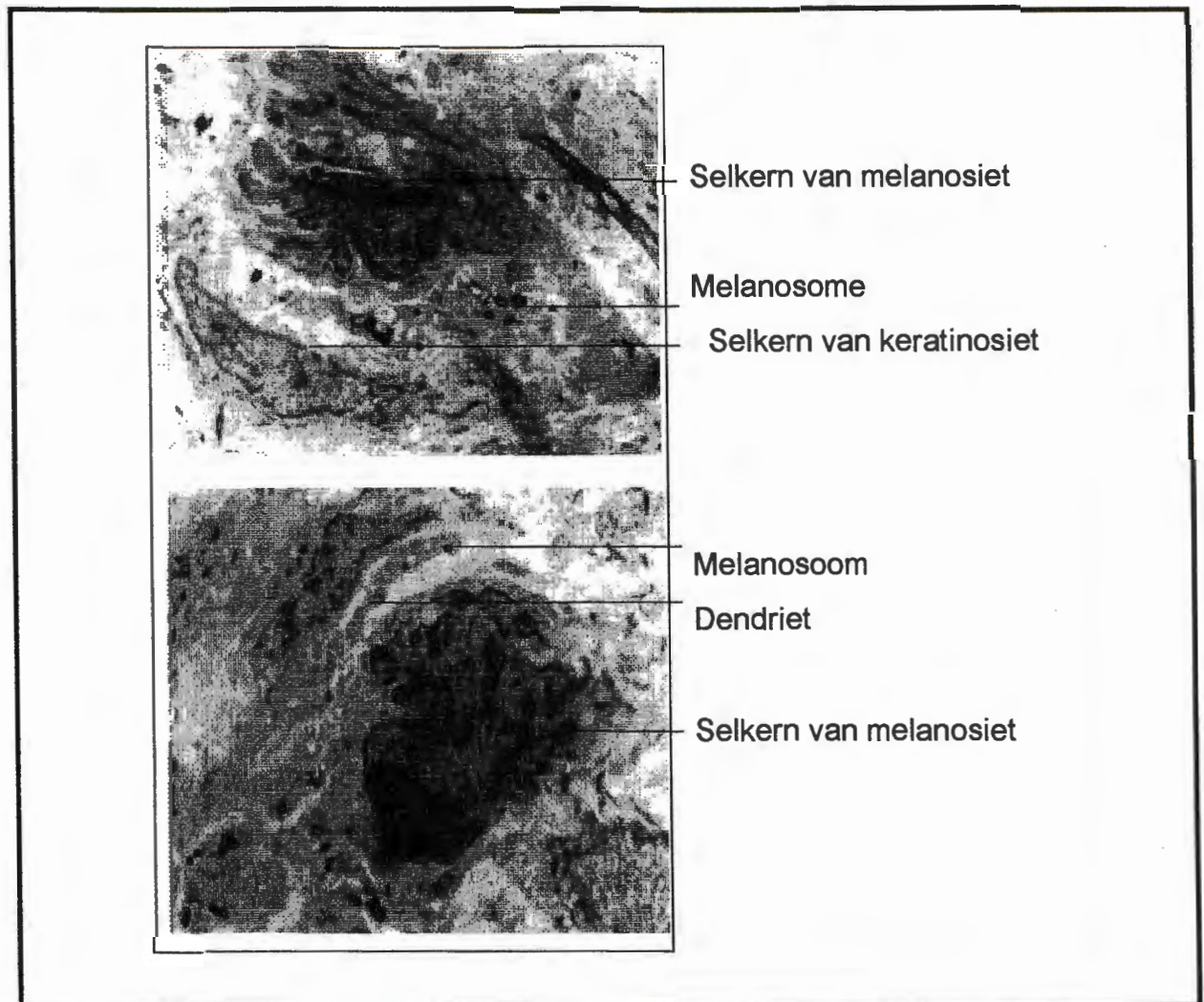
Vergroting: 33800x

1 μm _____

Figuur 5.7: Melansoomaggregaat van melanosome van verskeie ontwikkelingsfases.

Figuur 5.7 toon melanosome van verskeie fases van ontwikkeling wat saamgeaggregeer is in die sitoplasma van die keratinosiet. Die grootte van die fase 4 melanosoom is: 0.56 x 0.33 μm .

5.3.4 Melanosiete in die haarwortels van die pasiënt na L-DOPA inkubasie



Vergroting:6600x

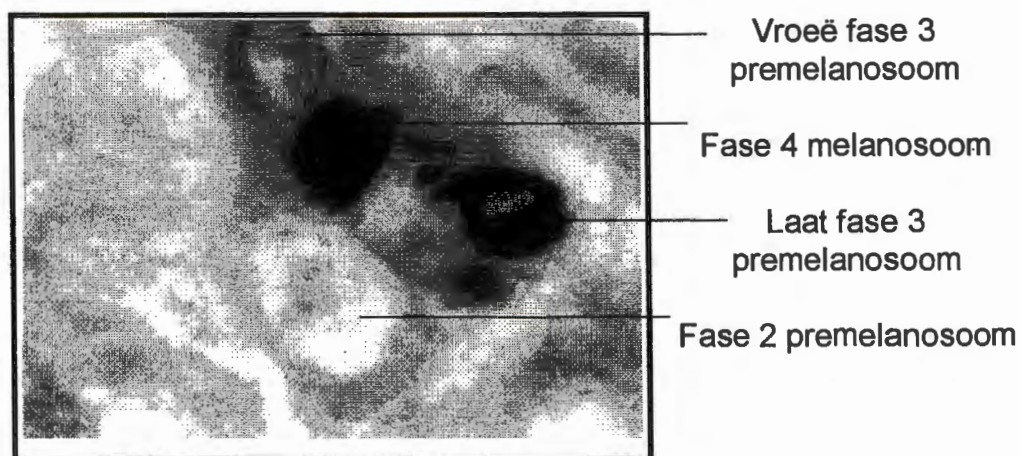
5µm

Figuur 5.8: Haarwortelmelanosiete na L-DOPA inkubasie

Die selle in figuur 5.8 toon die voorkoms van melanosiete want heelwat melanosome is sigbaar in die sitoplasma, geen tonofilamentbondels is sigbaar in die sitoplasma nie en geen desmosome kom voor in die selmembrane van die selle nie. Volledig ontwikkelde fase 4 melanosome is sigbaar asook fase 2 en 3 premelanosome. Sommige melanosome is in groepies saamgegroepeer in die sitoplasma, maar ander kom meer verspreid

deur die sitoplasma voor. Dendriete is sigbaar en in sommige dendriete kom volledig ontwikkelde melanosome voor.

5.3.5 Melanosome in die melanosiete van die haarwortels na L-DOPA inkubasie



Vergroting: 41600x

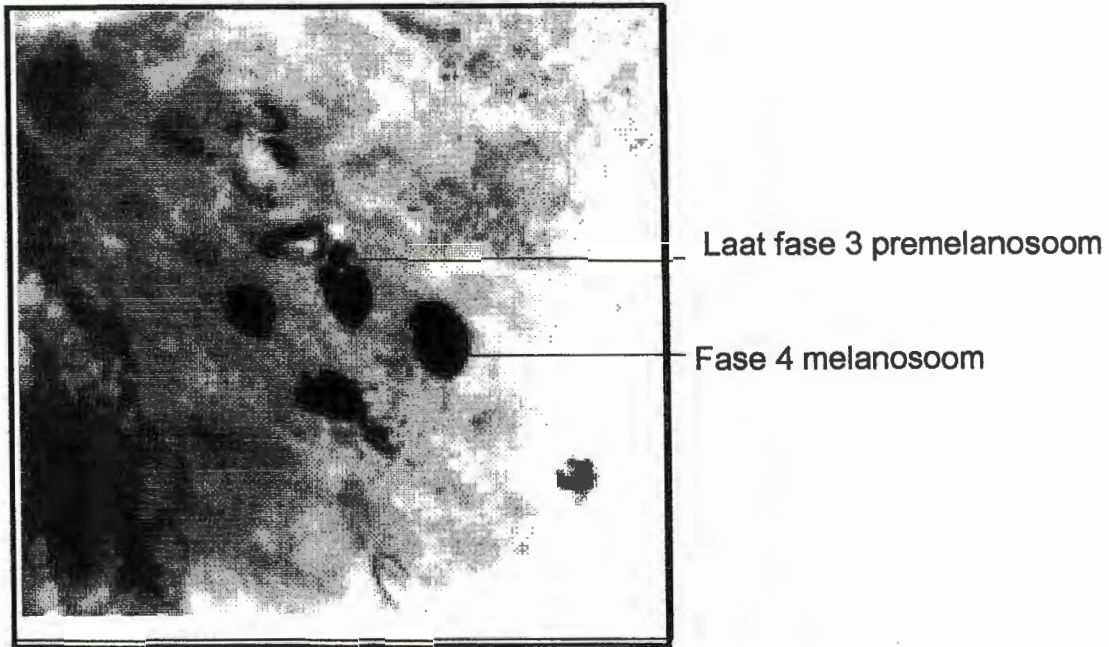
0.5µm

Figuur 5.9: Melanosome van verskeie ontwikkelingstadia.

Premelanosome in verskillende fases van ontwikkeling, naamlik fase 2 asook vroeë en laat fase 3, is sigbaar in figuur 5.9. Die grootte van die ongepigmenteerde fase 2 premelanosoom is: $0.46 \times 0.36 \mu\text{m}$. Die grootte van die volledig gepigmenteerde melanosome is: $0.34 \times 0.26 \mu\text{m}$.

Fase 3 premelanosome en fase 4 melanosome is sigbaar in fig 5.10. Die grootte van die volledig ontwikkelde melanosoom is: $0.34 \times 0.22 \mu\text{m}$.

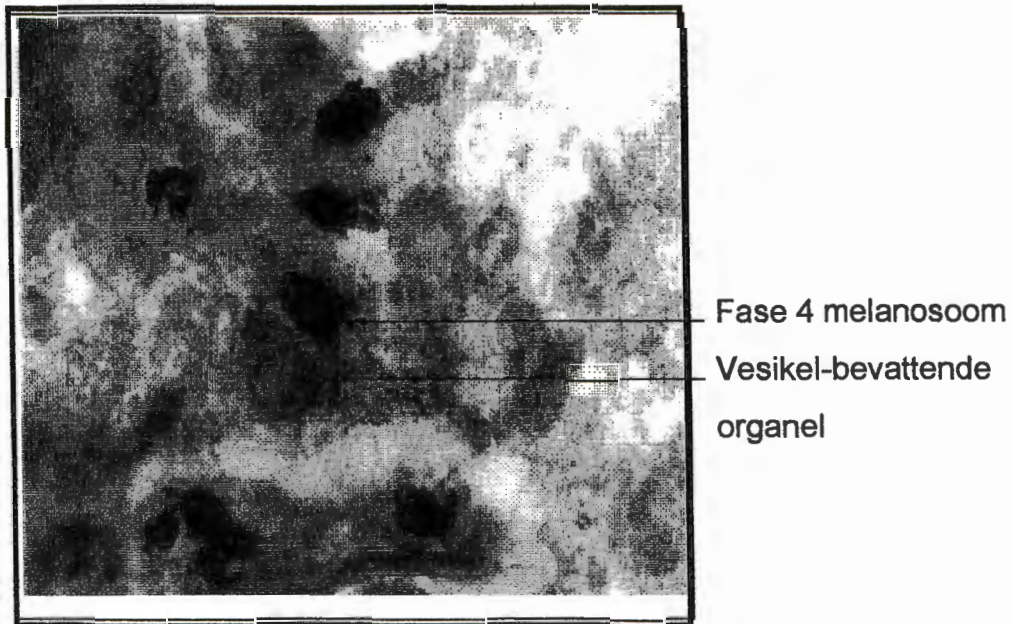
Fase 2 en 3 premelanosome en fase 4 melanosome is sigbaar in fig 5.11. Amper in die sentrum van die gesigsveld is 'n ongepigmenteerde, membraanomhulde organel sigbaar waarin vesikels voorkom. Links onder in die gesigsveld is 'n aantal melanosome en premelanosome van 'n verskeidenheid ontwikkelingsfases saamgegroeper. Die grootte van die volledig gepigmenteerde fase 4 melanosoom is: $0.31 \times 0.20 \mu\text{m}$.



Vergroting: 31667x

1 μ m

Figuur 5.10: Melanosome van ontwikkelingsfases 3 en 4.



Vergroting: 35625x

1 μ m

Figuur 5.11: Vesikel-bevattende organel tussen melanosome van verskeie ontwikkelingstadia.

Figuur 5.12 toon 'n nader aansig van die organel wat vesikels bevat, soos reeds getoon in figuur 5.11. Die grootte van hierdie organel is: 0,32 x 0,26 μm .



Vergroting: 46313x

1 μm

Figuur 5.12: Nader aansig van die vesikel-bevattende organel.

5.4 SAMEVATTING

Geen volledig ontwikkelde fase 4 melanosome kon waargeneem word in die selle van die haarwortels voor L-DOPA inkubasie nie. Slegs fase 2 en vroeë fase 3 premelanosome kon in die korteks en medullêre selle waargeneem word voor L-DOPA inkubasie. Geen abnormaliteite in die struktuur van premelanosome of melanosome is waargeneem nie. Na L-DOPA inkubasie is heelwat volledig ontwikkelde fase 4 melanosome en laat fase 3 premelanosome opgemerk in die sitoplasma van melanosiete en korteks en medullêre selle van die hare. Ook 'n vesikel-bevattende organel is opgemerk in 'n haarwortelmelanosiet na L-DOPA inkubasie.

Geen reuse melanosome (1-2 μm) kenmerkend van Chediak-Higashi sindroom is waargeneem in die haarwortel melanosiete van hierdie pasiënt

nie. Geen ander abnormaliteite is in die struktuur van melanosiete, melanosome of keratinosiete van die pasiënt opgemerk nie.

HOOFSTUK 6

ONDERSOEK OOR LIGGAAMSVLOEISTOFVERDONKERING

6.1 INLEIDING

Die ouers en geneesheer van die pasiënt het opgemerk dat die uriene, speeksel en sweet van die pasiënt voorheen op sekere tye verdonker het wanneer dit aan lug blootgestel is. Hierdie liggaamsvloeistowwe het dan haar klare swart laat verkleur. Tydens hierdie fases van verdonkering het die pasiënt 'n baie lae energievlak gehad en soms het die verdonkering plaasgevind tegelyk met infeksie, gewoonlik van die blaas.

Daar kan verskeie redes wees waarom die liggaamsvloeistowwe in die verlede verdonker het. Verbindinge wat moontlik liggaamsvloeistowwe kan laat verdonker is: hemoglobien, bilirubien, porfiriene, homogentisiensuur, indikan (indoksielsulfaat), voedsel, kleurstowwe, medikasie of melaniënverwante metaboliete (McClements *et al.*, 1988; Kaplan & Pesce, 1989).

Die pasiënt vertoon hipopigmentering en het dus moontlik 'n afwyking wat die melaniën biosintese-weg nadelig beïnvloed. Daar bestaan 'n moontlikheid dat die verdonkering van die uriene direk verband hou met die beeld van hipopigmentering. Eumelaniën is 'n donkerbruin na swart polimeriese verbinding (Seraglia *et al.*, 1993). Heelwat van die verbindinge wat deel vorm van die melaniën biosintese-weg is baie labiel en kan spontaan polimeriseer na 'n swart verbinding (Hearing & Tsukamoto, 1991). Daar is dus 'n moontlikheid dat, indien voorgangers van melaniën in verhoogde vlakke in die liggaamsvloeistowwe voorkom, hierdie verbindinge kan polimeriseer na melaniën en die vloeistowwe kan laat verdonker (Boivin *et al.*, 1993).

Aangesien die pasiënt hipopigmentering vertoon is daar vir die doel van hierdie ondersoek veral gekonsentreer op die moontlikheid dat verhoogde vlakke van melaniënverwante metaboliete in die uriene, speeksel en sweet die oorsaak mag wees van verdonkering van liggaamsvloeistowwe by die pasiënt. Ander moontlike oorsake van liggaamsvloeistofverdonkering is ook ondersoek deur middel van siftingstoetse en bestudering van die kliniese beeld. Die invloed van medikasie op die analise van melaniënverwante metaboliete in die uriene van die pasiënt is in ag geneem. Sinemet, een van die medikamente wat die pasiënt neem, bevat die aktiewe bestanddeel L-DOPA, wat 'n intermediêr in die melaniën biosintese-weg is (Hansson, 1988).

Die organiese sure in die pasiënt se uriene is gekwantifiseer deur middel van gaschromatografie met vlam-ionisasie deteksie. Hierdie kwantifisering is gedoen om te bepaal of melaniënverwante metaboliete en Sinemet-verwante metaboliete, byvoorbeeld HVA, DOPAC en VMA, in verhoogde vlakke voorkom in uriene wat verdonker het. Die gaschromatografiese profiel van kontrole urienemonsters toon sekere karakteristieke pieke. Die gaschromatografiese profiel van die organiese sure in die pasiënt se uriene is ondersoek om vas te stel of daar enige pieke, wat afwyk van die normale profiel van kontrole uriene, daarin voorkom. Daar is gebruik gemaak van massaspektrometrie om sommige verbindings in die gaschromatografiese profiel te identifiseer.

Volgens 'n geneesheer van die pasiënt is liggaamsvloeistofverdonkering in die verlede soms geassosieer met verhoogde proteïeninnam. Om hierdie rede is die aminosuurvlakke in die uriene van die pasiënt gekwantifiseer. Aangesien tirosien die beginsubstraat in die melaniën biosintese-weg is, was die kwantifisering van hierdie aminosuur in die pasiënt se uriene veral van belang.

Verhoogde urinêre vlakke van die melaniënverwante metaboliete, 5SSD, 6H5MI2K, L-DOPA, OMD en DA, kan lei tot die verdonkering van uriene

(Banda, 1977; McClements *et al.*, 1988). Hierdie verbindings is gekwantifiseer in die uriene van die pasiënt deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie.

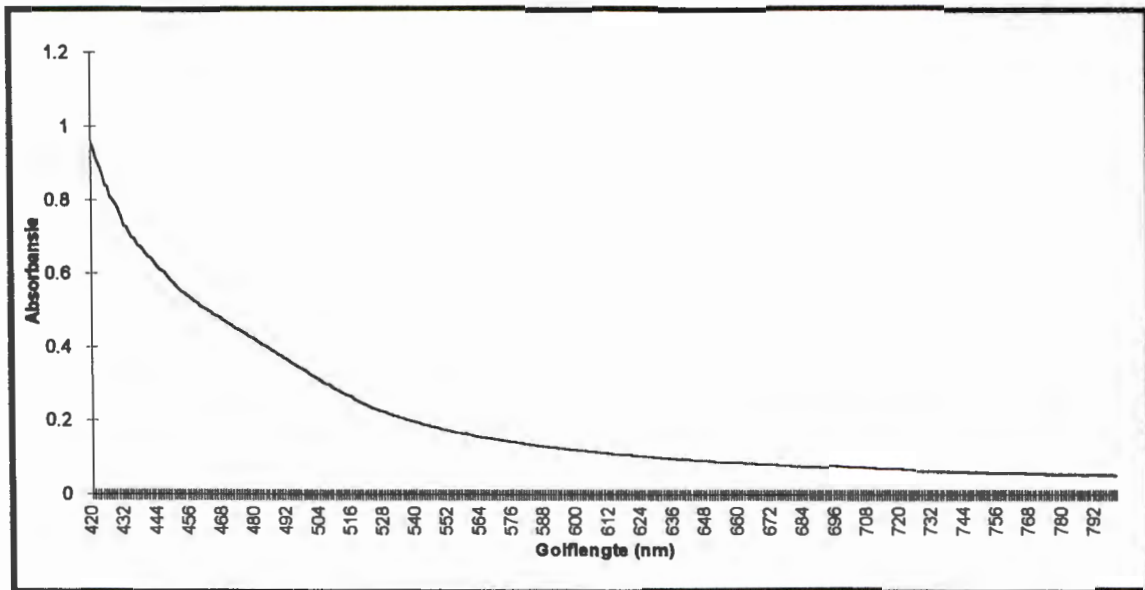
Onbekende verbindings in die swart en bruin vlekke op die pasiënt se klere is opgelos in 'n alkaliese medium, geëkstraheer met organiese oplosmiddels en gederivatiseer. Die gederivatiseerde onbekende verbindings is geanaliseer deur middel van gaschromatografie en deur elektrospoei-massaspektrometrie.

6.2 RESULTATE

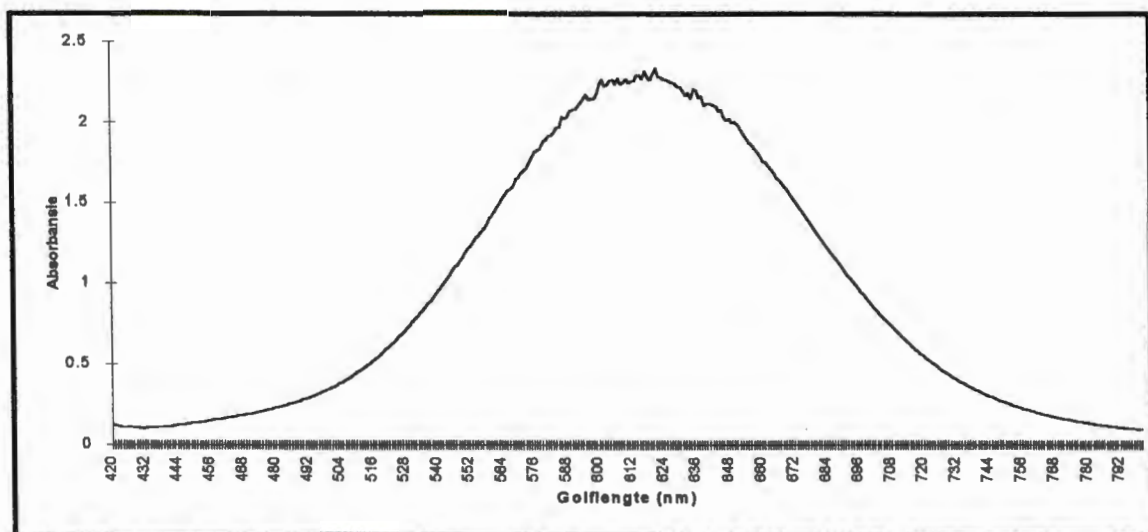
6.2.1 Siftingstoetse

Die resultate van die siftingstoetse wat uitgevoer is volgens die metodes beskryf onder punt 4.2.2 in hoofstuk 4 was negatief. Die pH van die verskillende urienemonsters het gewissel van 7.0 tot 8.5. Die Labstixtoets het aangetoon dat sommige urienemonsters, wat geneem is gedurende tye van verdonkering asook tye sonder verdonkering, spoorhoeveelhede proteïene bevat het. Een urienemonster het egter positief getoets met die ysterchloried toets. Hierdie monster het 'n pers-bruin kleur gehad na die uitvoer van die ysterchloried toets.

Geen van die urienemonsters van die pasiënt het 'n positiewe Thormählen-toets getoon nie. Sommige van die monsters het wel 'n dubbelsinnige resultaat gelewer, aangesien dit 'n effense geelgroen kleur getoon het na die uitvoer van die Thormählen-reaksie. Spektrofotometriese ondersoek van hierdie kleurreaksie in die uriene van die pasiënt het egter geen verhoogde absorpsie by 610-612 nm getoon nie [figuur 6.1(a)] in teenstelling met die duidelik verhoogde absorpsie by 610-612 nm verkry wanneer dié kleurreaksie uitgevoer is op die positiewe kontrole, indool [figuur 6.1 (b)].



Figuur 6.1(a): Die absorpsiespektrum van uriene van die pasiënt na uitvoering van die Thormählen reaksie.



Figuur 6.1(b): Die absorpsiespektrum van die positiewe kontrole, indool, na uitvoer van die Thormählen reaksie.

6.2.2 Die konsentrasie van organiese sure in die urienemonsters van die pasiënt

Ondersoek is ingestel of organiese sure wat verband hou met melanien metabolisme asook L-DOPA en tirosien katabolisme in verhoogde vlakke

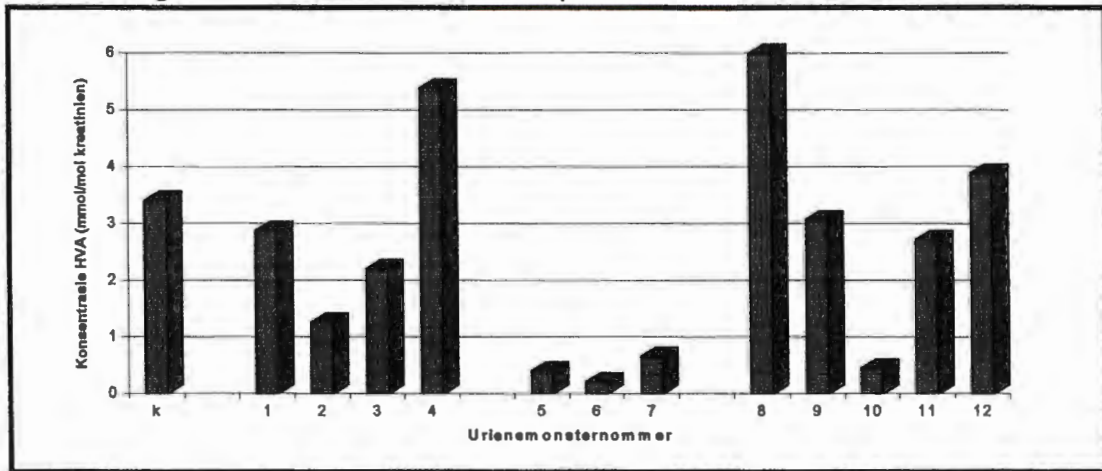
voorkom in sekere van die urienemonsters van die pasiënt. Hierdie organiese sure is gekwantifiseer volgens die metode beskryf onder punt 4.2.4 in hoofstuk 4. Daar is veral ondersoek of die urinêre vlakke van hierdie metaboliëte besonder gewysig is gedurende periodes dat die speeksel en uriene van die pasiënt verdonker het. Die volgende grafieke is voorstellings van die vlakke van sekere organiese sure gedurende tye dat liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het terwyl die pasiënt met Sinemet behandel is, tye dat geen verdonkering plaasgevind het nie terwyl die pasiënt met Sinemet behandel is en tye dat die medikasie van die pasiënt verminder is.

HVA is een van die hoof urinêre metaboliëte afkomstig van die katabolisme van L-DOPA en DA (Martin *et al.*, 1985; Jimbow *et al.*, 1993). Figuur 6.2 en 6.3 gee 'n aanduiding van hoedat die HVA konsentrasie in die urienemonsters beïnvloed is deur Sinemet behandeling en gee ook 'n aanduiding of die HVA konsentrasie heelwat gewysig is gedurende tye dat die liggaamsvloeistowwe van die pasiënt verdonker het.

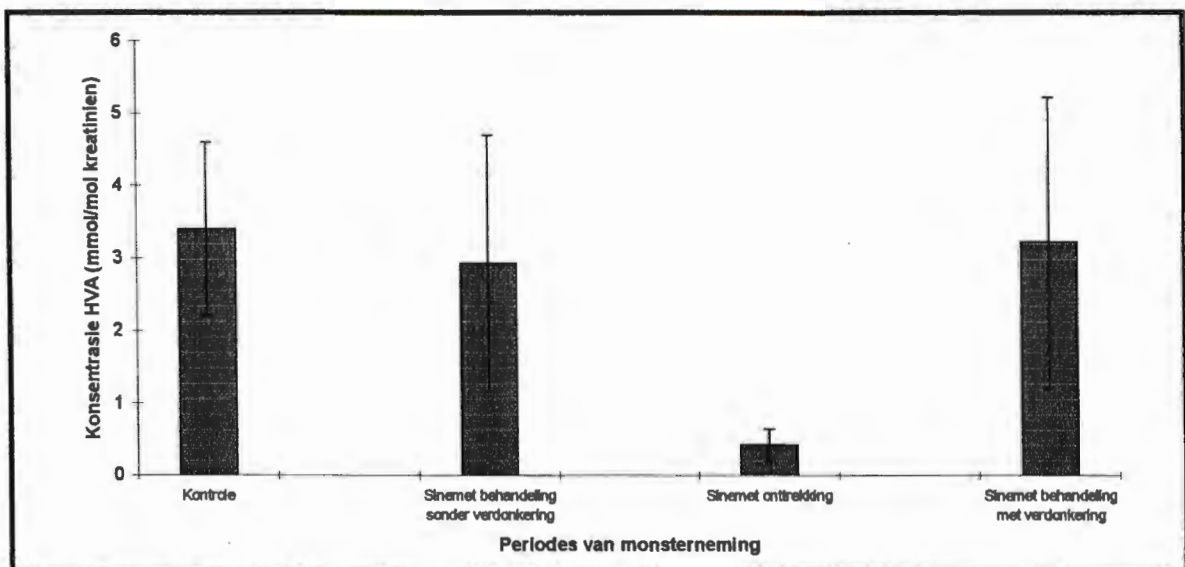
In figuur 6.2 dui **k** op die gemiddelde normale urinêre konsentrasie van HVA by persone van 10 tot 16 jaar (Ito *et al.*, 1985). Monsters 1 tot 4 is geneem gedurende tye dat geen liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het nie terwyl die pasiënt met Sinemet behandel is. Monsters 5 tot 7 is geneem gedurende tye dat die dosis Sinemet verminder is en monster's 8 tot 12 is geneem gedurende tye dat liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het terwyl die pasiënt met Sinemet behandel is. Figuur 6.3 gee 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.2. Elke punt in die reeks in figuur 6.3 verteenwoordig die gemiddelde HVA waarde met die standaardafwykings aangetoon as foutgrense.

Vanuit figuur 6.2 en 6.3 is dit duidelik dat die urinêre HVA konsentrasie heelwat verlaag is gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is, maar nie noemenswaardig verhoog of verlaag is gedurende tye van verdonkering nie.

Die konsentrasie HVA in die uriene gedurende tye van verdonkering stem ooreen met die konsentrasie van hierdie metaboliet in die uriene van kontrole-persone en uriene afkomstig van tye dat die pasiënt op Sinemet behandeling was maar liggaamsvloeistofverdonkering nie plaasgevind het nie. Die HVA konsentrasie in die uriene van die pasiënt val binne die normaalgrense vir hierdie metaboliet gedurende tye dat sy met Sinemet behandel is. Gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is was die urinêre HVA konsentrasie besonder verlaag; laer as die konsentrasie HVA wat normaalweg voorkom in die uriene van persone van haar ouderdom.

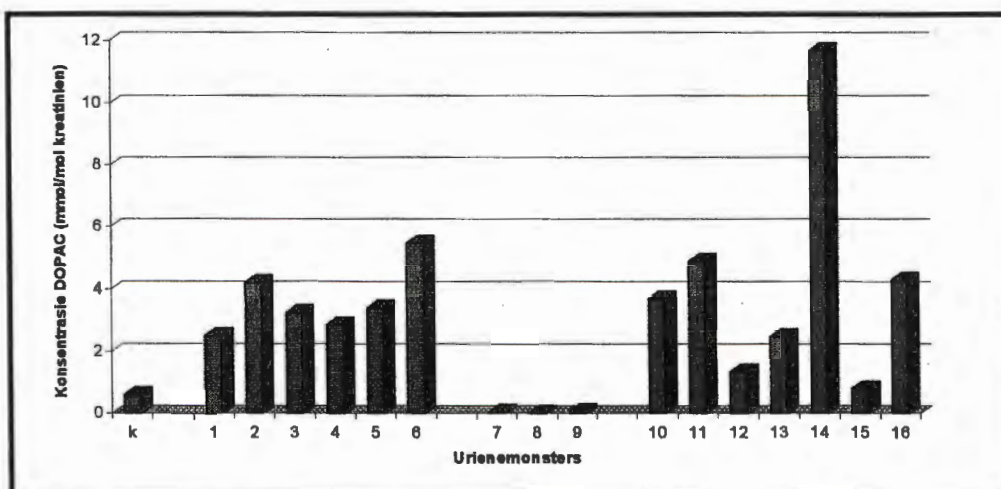


Figuur 6.2 Die HVA konsentrasies in spesifieke urienemonsters van die pasiënt.



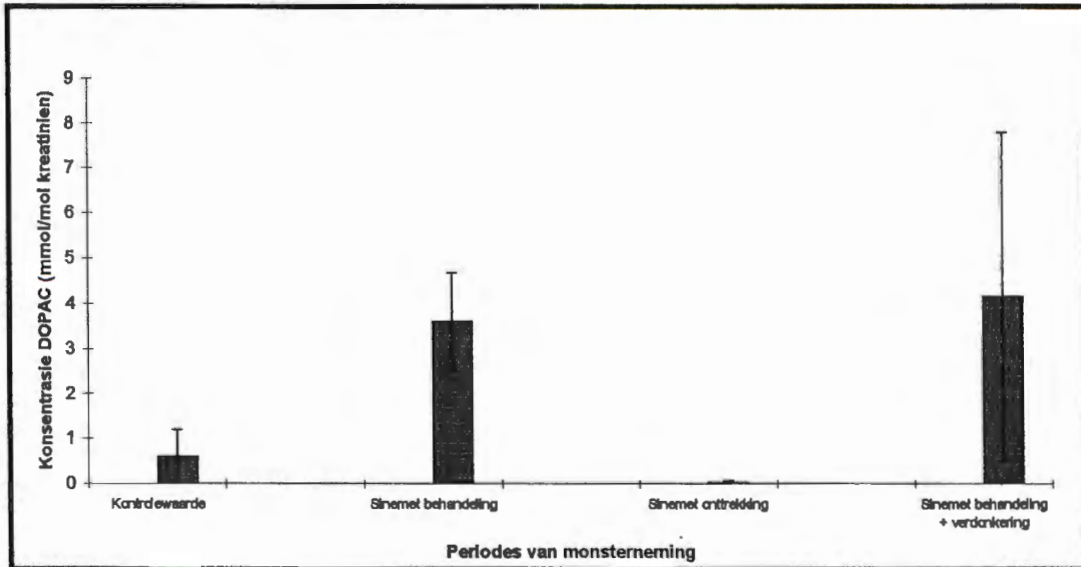
Figuur 6.3 : Die gemiddelde HVA konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

DOPAC is nog 'n urinêre metaboliet afkomstig van die katabolisme van L-DOPA en DA (Martin *et al.*, 1985). Figuur 6.4 en 6.5 toon hoedat die konsentrasie van hierdie metaboliet beïnvloed is deur medikasie en of die vlakke van hierdie metaboliet verander het gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering. Die simbool K in figuur 6.4 dui die gemiddelde DOPAC konsentrasie in die uriene van kontrolepersone van 10 tot 16 jarige ouderdom aan (Ito *et al.*, 1985). Monsters 1 tot 6 is geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is, maar geen liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het nie. Monsters 7 tot 9 is geneem gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is. Monsters 10 tot 16 is geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is en liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het.



Figuur 6.4: DOPAC konsentrasies in die urienemonsters van die pasiënt.

Figuur 6.5 bied 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.4. Elke punt in figuur 6.5 toon die gemiddelde waarde met die standaardafwyking aangetoon as foutgrense.

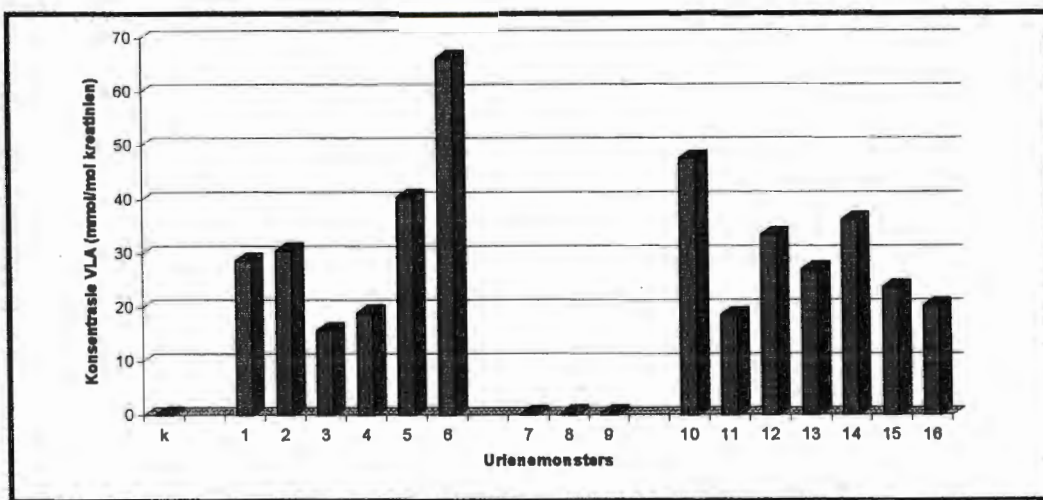


Figuur 6.5 : Die gemiddelde DOPAC konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

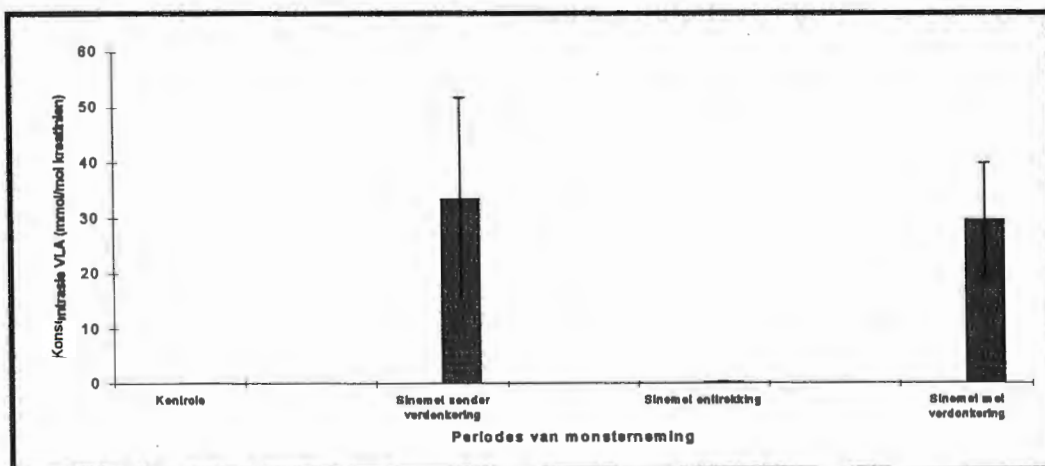
Vanuit figure 6.4 en 6.5 is dit duidelik dat die vlakke van DOPAC duidelik verlaag is gedurende tye dat die Sinemet medikasie van die pasiënt verlaag is. Monsters van tye dat die pasiënt wel met die volle dosis Sinemet behandel is toon wisselende konsentrasies DOPAC. DOPAC konsentrasies is nie noemenswaardig verlaag of verhoog gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering in vergelyking met tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Slegs by een monster, geneem gedurende 'n tydperk van liggaamsvloeistofverdonkering, is 'n duidelike verhoging in DOPAC konsentrasie sigbaar. Gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is was die urinêre DOPAC konsentrasie van die meeste urienemonsters verhoog bokant die normaalgrense. Die konsentrasie van DOPAC in die pasiënt se uriene gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is, is besonder laag, maar val binne die normaalgrense vir hierdie metaboliet.

VLA is 'n belangrike metaboliet van O-metieldopa (Bartholini *et al.*, 1972; Hyland *et al.*, 1996). Figuur 6.6 en 6.7 toon die resultate van die ondersoek na die konsentrasie van hierdie verbinding in die pasiënt se uriene.

Die simbool **K** in figuur 6.6 dui die datapunt aan wat die gemiddelde normale VLA konsentrasie weergee (Muskiel *et al.*, 1978; Hyland *et al.*, 1992; Hyland *et al.*, 1996). Monsters 1 tot 6 is geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is, maar geen liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het nie. Monsters 7 tot 9 is geneem gedurende tye dat die dosis Sinemet wat die pasiënt neem verlaag is. Monsters 10 tot 16 is geneem gedurende tye dat liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het en die pasiënt met Sinemet behandel is.



Figuur 6.6: VLA konsentrasies in die urinenemonsters van die pasiënt.



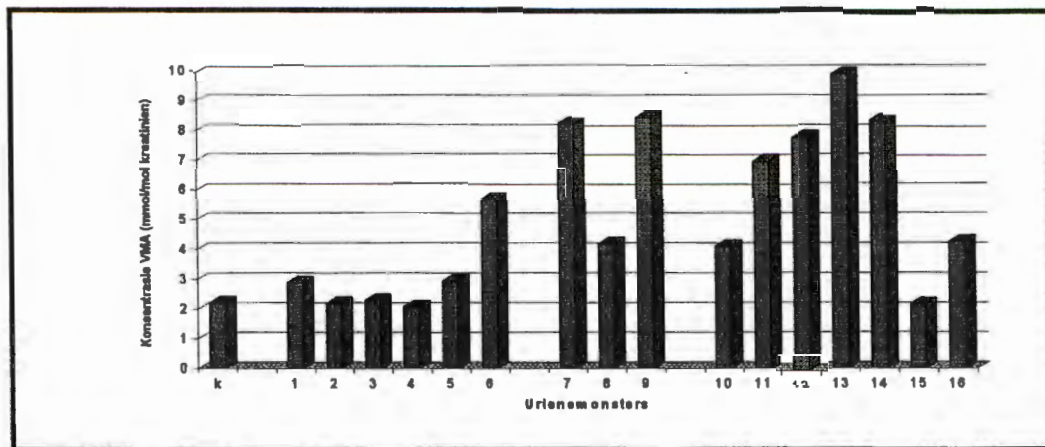
Figuur 6.7 Die gemiddelde VLA konsentrasies in urinenemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

Figuur 6.7 verleen 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.6. Elke datapunt in figuur 6.7 verteenwoordig 'n gemiddelde waarde met die standaardafwyking aangedui as foutgrense.

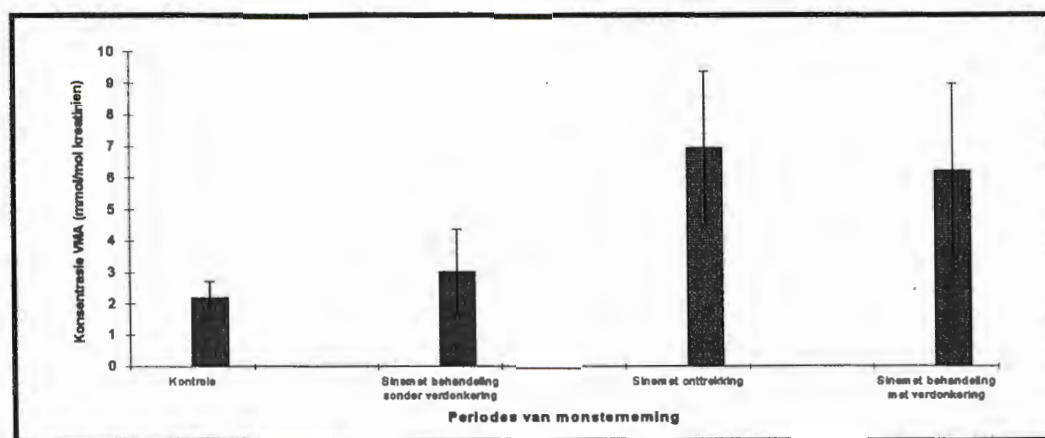
Vanuit figuur 6.6 en 6.7 is dit duidelik dat die VLA konsentrasie in die uriene geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is geweldig verhoog is in vergelyking met die normale urinêre konsentrasie van hierdie metaboliet. 'n Verlaging in die Sinemet dosis het 'n baie groot verlaging in die urinêre VLA konsentrasie veroorsaak. Die urinêre VLA konsentrasie in die monsters geneem gedurende tydperke van liggaamsvloeistofverdonkering het nie 'n noemenswaardige wysiging getoon in vergelyking met die VLA konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is maar liggaamsvloeistofverdonkering nie plaasgevind het nie.

VMA is 'n belangrike urinêre metaboliet van adrenalien en noradrenalien katabolisme (Newsholme & Leech, 1983; Martin *et al.*, 1985; Jimbow *et al.*, 1993). Figuur 6.8 en 6.9 toon die resultate van die ondersoek na die konsentrasie van VMA in die urienemonsters van die pasiënt.

Die simbool k in figuur 6.8 dui die datapunt aan wat die gemiddelde normale urinêre konsentrasie VMA vir persone van 10 tot 16 jarige ouderdom weergee (Ito *et al.*, 1985; Hyland *et al.*, 1996). Monsters 1 tot 6 is geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is maar geen verdonkering van liggaamsvloei-stowwe plaasgevind het nie. Monsters 7 tot 9 is geneem gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is. Monsters 10 tot 16 is geneem gedurende tye dat die pasiënt behandel is met Sinemet en verdonkering van liggaamsvloei-stowwe plaasgevind het. Figuur 6.9 bied 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.8.



Figuur 6.8: VMA konsentrasies in die urienemonsters van die pasiënt.

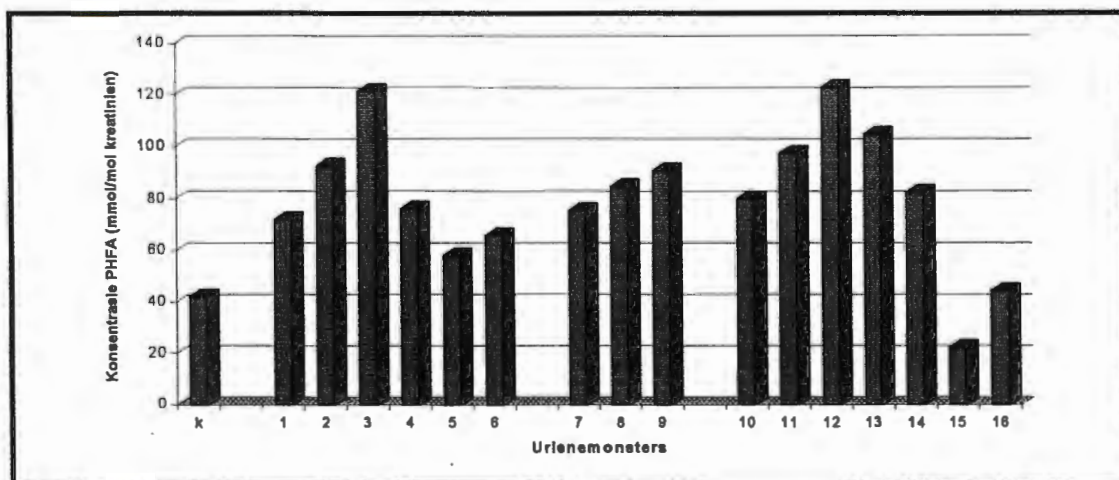


Figuur 6.9: Die gemiddelde VMA konsentrasies in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

In teenstelling met die ander katesjolaklamien metaboliete, soos DOPAC en HVA, is die konsentrasie van VMA nie verlaag in die urienemonsters geneem gedurende tye dat die Sinemet dosis verlaag is nie. Die VMA konsentrasie is verhoog gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering in vergelyking met tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Die VMA konsentrasie in urienemonsters, geneem gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering, stem egter ooreen met die vlak van hierdie metaboliet in urienemonsters, geneem gedurende tye dat die Sinemet dosis verlaag is en geen liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het nie.

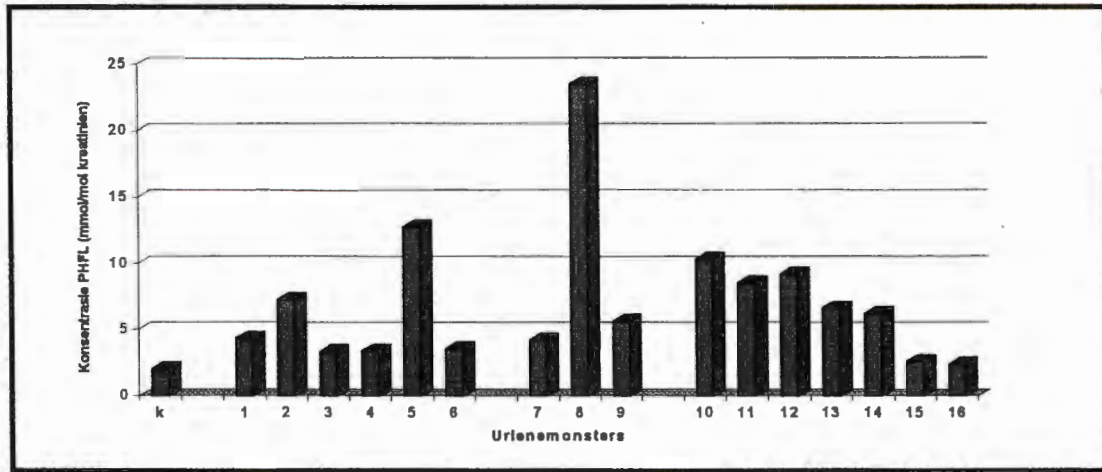
Daar is opgemerk dat 4-HFA en 4-HFL in verhoogde vlakke voorkom in sommige van die urienemonsters van die pasiënt. Hierdie twee verbindings is

belangrike alternatiewe metaboliete van tirosien (Martin *et al.*, 1985), die beginsubstraat van die melanien biosintese-weg (Hearing & Tsukamoto, 1991). Figuur 6.10 tot 6.13 toon die resultate van die ondersoek na die 4-HFA en 4-HFL konsentrasies in die urienemonsters van die pasiënt.



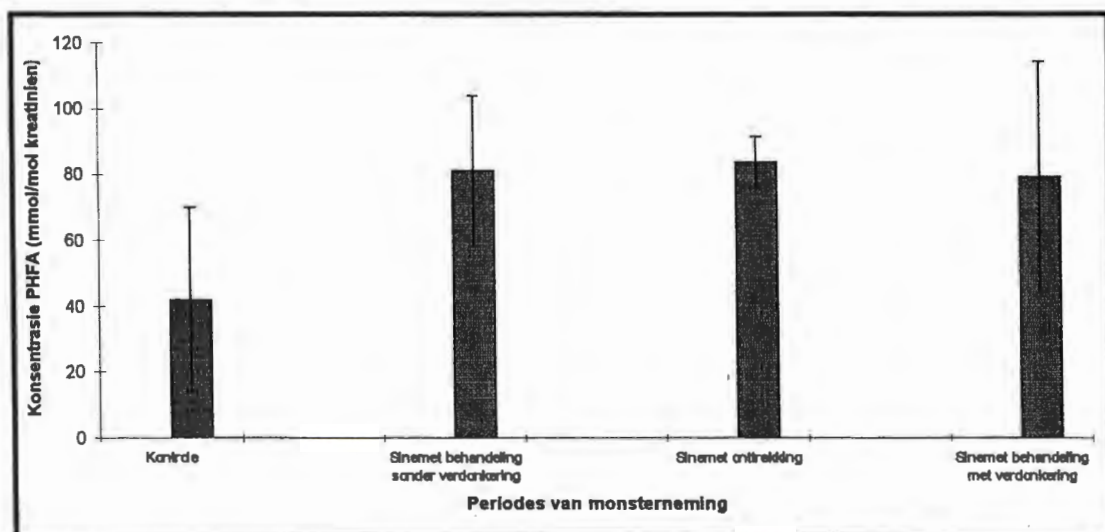
Figuur 6.10: 4-HFA konsentrasie in die urienemonsters van die pasiënt.

Die simbool **k** in figuur 6.10 en 6.11 dui die datapunt aan wat die gemiddelde normale urinêre konsentrasie 4-HFA en 4-HFL onderskeidelik vir persone van 10 tot 12 jarige ouderdom weergee (Chalmers & Lawson, 1982). Monsters 1 tot 6 is geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is maar geen verdonkering van liggaamsvloeistowwe plaasgevind het nie. Monsters 7 tot 9 is geneem gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is. Monsters 10 tot 16 is geneem gedurende tye dat die pasiënt behandel is met Sinemet en verdonkering van liggaamsvloeistowwe plaasgevind het.

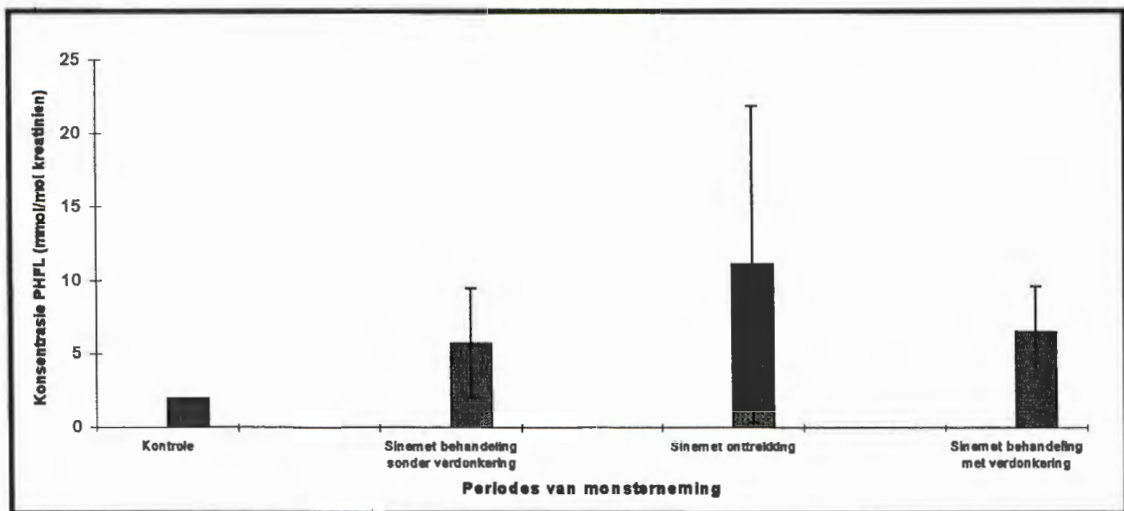


Figuur 6.11: 4-HFL konsentrasie in urienemonsters van die pasiënt.

In meeste urienemonsters val die 4-HFA konsentrasie binne die hoër normale gebied. In sommige van die urienemonsters van die pasiënt is die 4-HFA en 4-HFL konsentrasie hoër as die normale urinêre konsentrasie vir hierdie metaboliete. Figuur 6.12 en 6.13 toon 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.10 en 6.11 onderskeidelik. By elke datapunt in figuur 6.12 en 6.13 word die gemiddelde waarde met die standaardafwyking in die vorm van foutgrense weergegee.



Figuur 6.12: Die gemiddelde konsentrasie 4-HFA in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.



Figuur 6.13: Die gemiddelde konsentrasie 4-HFL in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

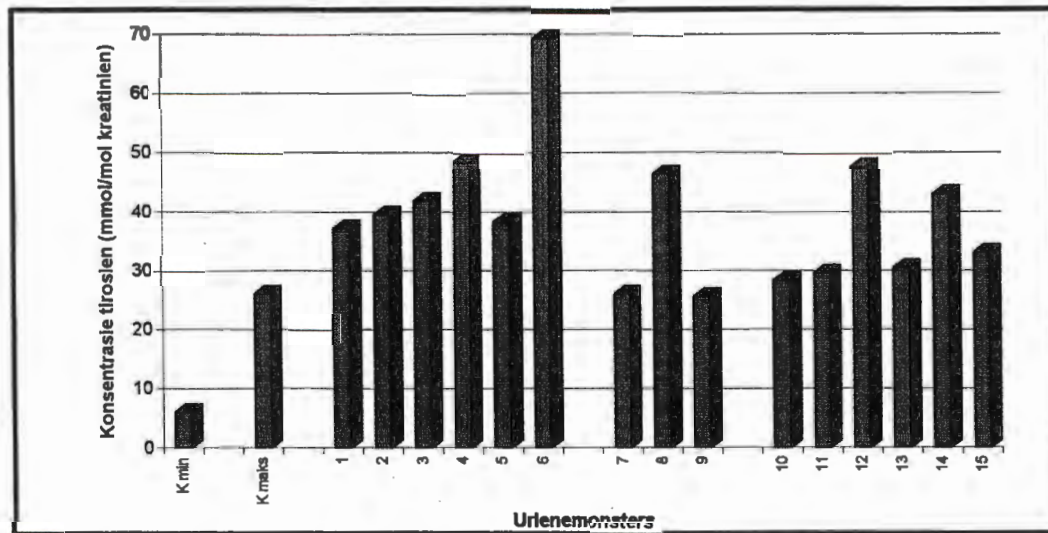
Vanuit figuur 6.10, 6.11, 6.12 en 6.13 is dit duidelik dat die urinêre konsentrasie van 4-HFA en 4-HFL wisselend is en nie beïnvloed is deur wysiging in die medikasie (monsters 7-9) van die pasiënt nie en ook nie dramaties verhoog of verlaag is gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering (monsters 10-16) in vergelyking met tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie (monsters 1-6).

6.2.3 Die konsentrasie van aminosure in die verskillende urienemonsters van die pasiënt

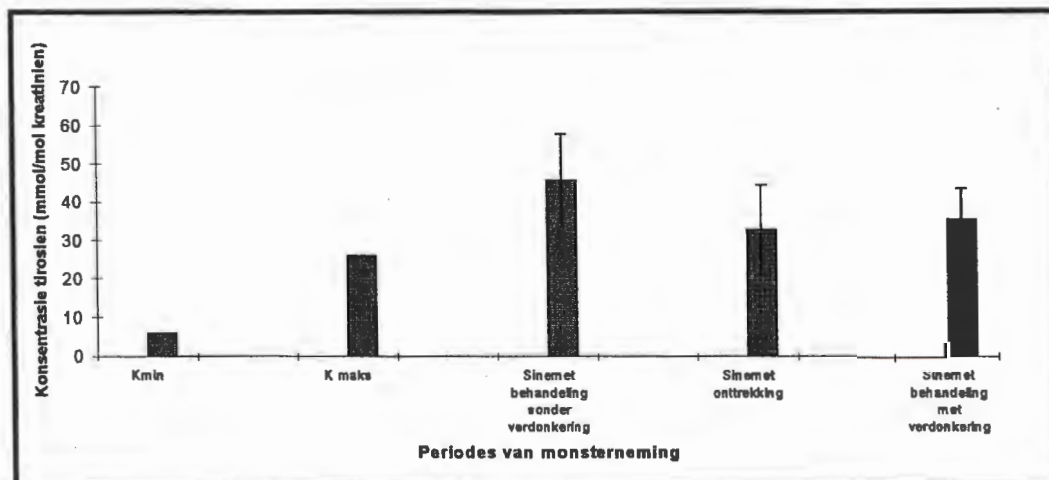
Die konsentrasie van aminosure in die pasiënt se uriene is gemonitor volgens die metode beskryf onder punt 4.2.5 in hoofstuk 4. Figure 6.14 tot 6.19 toon hoedat die vlakke van die aminosure tirosien, fenielalanien en triptofaan in die urienemonsters van die pasiënt gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering vergelyk met die urinêre vlakke van hierdie aminosure gedurende tye dat die liggaamsvloeistowwe nie verdonker het nie.

Die simbole K_{min} en K_{maks} in figuur 6.14 en 6.16 toon die normale urinêre minimum en maksimum konsentrasies van tirosien en fenielalanien onderskeidelik aan (Bremer *et al.*, 1981). Die simbool K_{maks} in figuur 6.18 toon die normale urinêre maksimum konsentrasie van triptofaan aan (Bremer

et al., 1981). Die uriemonsters 1-6 is geneem gedurende periodes dat die pasiënt met Sinemet behandel is, maar nie verdonkering van liggaamsvloeistowwe getoon het nie. Uriemonsters 7-9 is geneem gedurende periodes dat die pasiënt met 'n verminderde dosis Sinemet behandel is. Uriemonsters 10-15 is geneem gedurende periodes dat die liggaamsvloeistowwe van die pasiënt verdonker het.

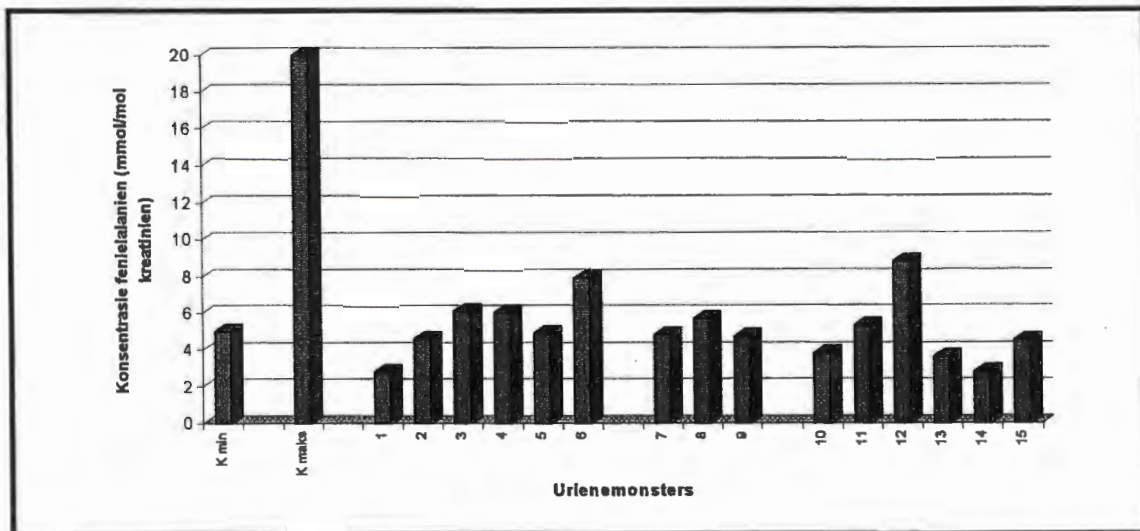


Figuur 6.14: Die vlakke van tirosien in die uriene van die pasiënt.

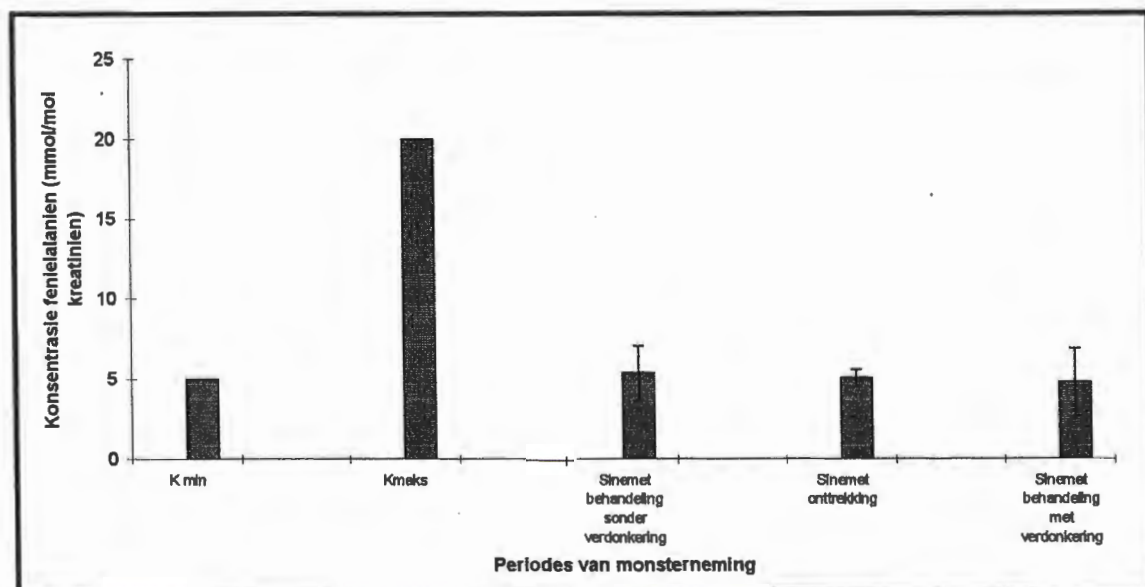


Figuur 6.15: Die gemiddelde konsentrasie tirosien in uriemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

Figuur 6.15 toon 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.14. Figuur 6.17 toon 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.16.. Figuur 6.19 toon 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.18.

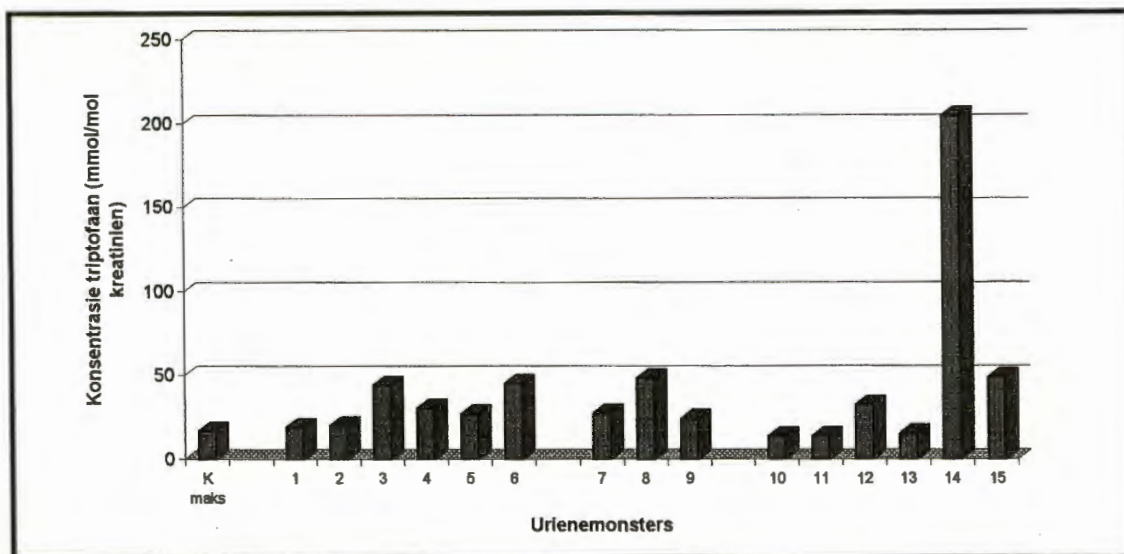


Figuur 6.16: Die vlakke van fenielalanien in die uriene van die pasiënt.

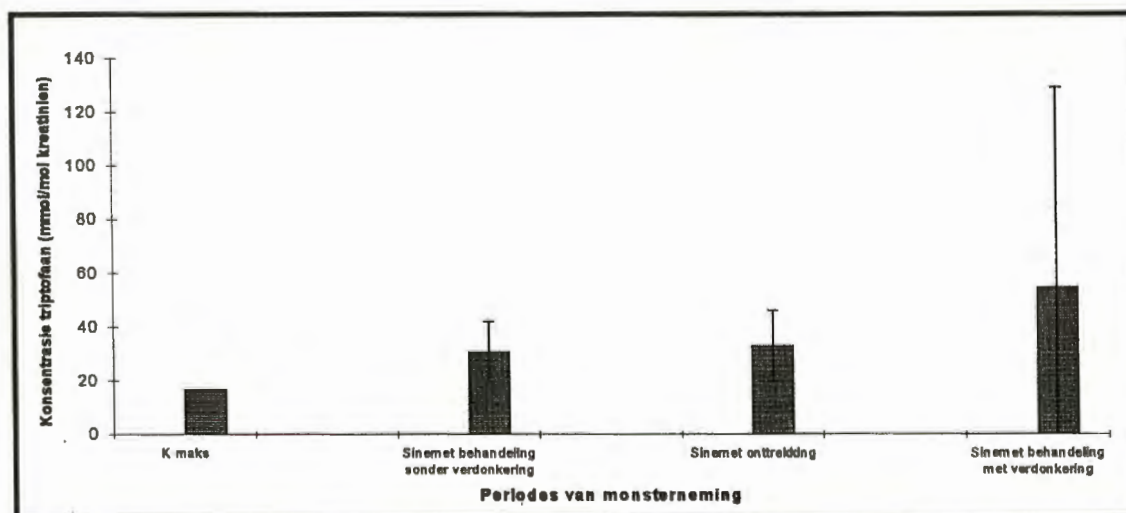


Figuur 6.17: Die gemiddelde konsentrasie fenielalanien in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

In heelwat van die urienemonsters van die pasiënt kom tirosien voor in vlakke hoër as die maksimum normaalwaarde. Die fenielalanien konsentrasie in al die urienemonsters van die pasiënt het egter geval binne die normale konsentrasiegebied.



Figuur 6.18: Die vlakke van triptofaan in die uriene van die pasiënt.



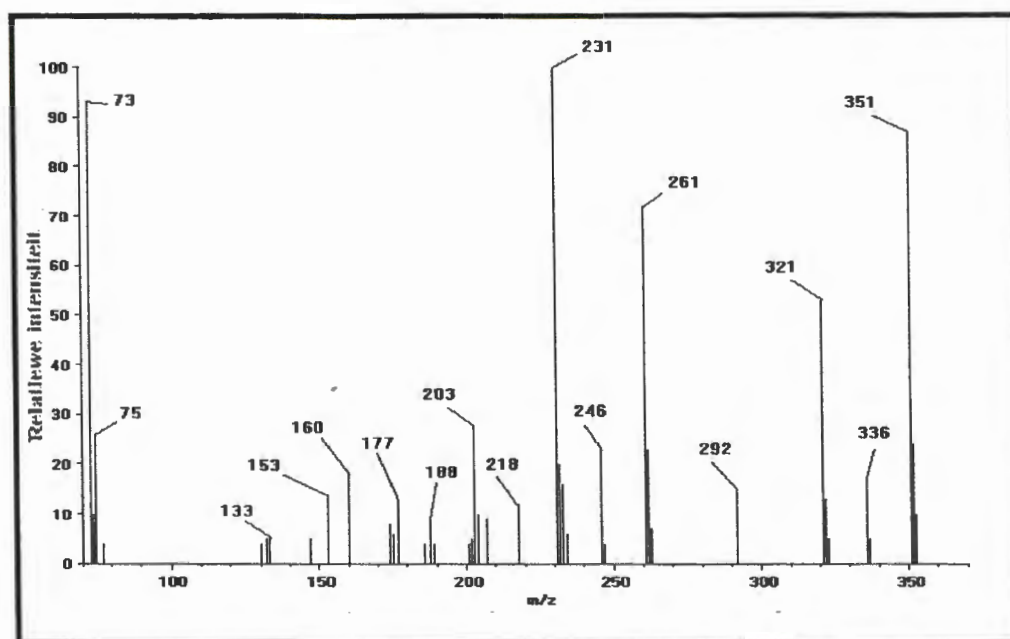
Figuur 6.19: Die gemiddelde konsentrasie triptofaan in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

Uit figure 6.14 tot 6.19 blyk dat 'n wysiging in die Sinemet medikasie nie die urinêre tirosien, feniëalanien of triptofaan vlakke beïnvloed het nie. Nie tirosien, feniëalanien of triptofaan het in hoër vlakke voorgekom in die uriene van die pasiënt gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering in vergelyking met urinêre vlakke van hierdie aminosure gedurende tye dat liggaamsvloeistofverdonkering nie plaasgevind het nie. Slegs in een urienemonster (monster 14), afkomstig van 'n tydperk van liggaamsvloeistofverdonkering, was die triptofaan konsentrasie baie hoog.

Die vlakke van ander aminosure in die urienemonsters geneem gedurende tye van verdonkering het ook nie dramatiese verskille getoon van die urinêre vlakke van hierdie aminosure gedurende tye dat die uriene nie verdonker het nie.

6.2.4 Die analise van 'n indoliese melanien metaboliet, 6H5MI2K.

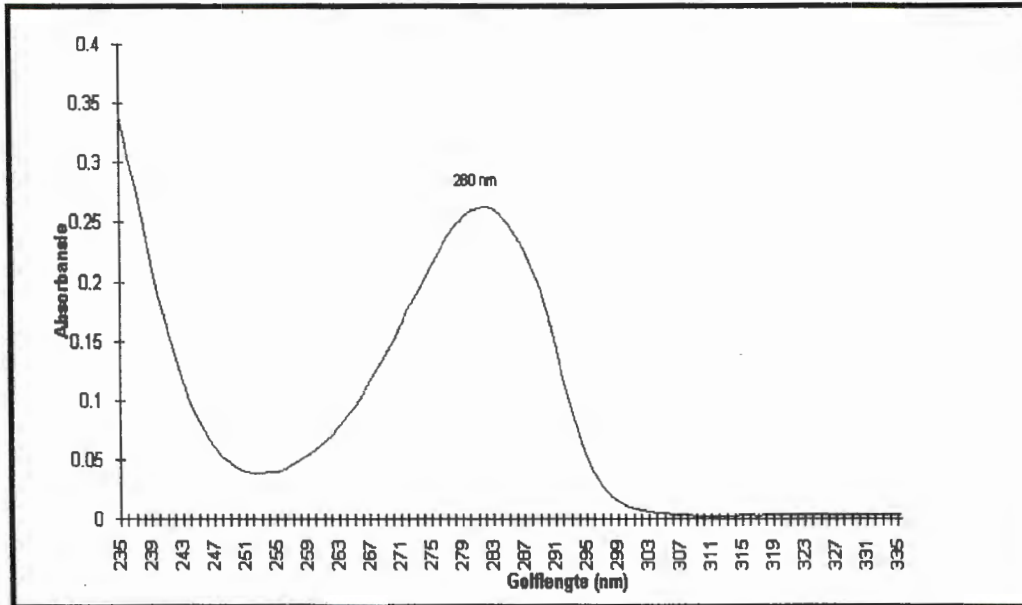
Volgens Duthel & Vallon (1991) toon die massaspektrum van gesilaneerde 6H5MI2K 'n molekulêre ioon met 'n massa van 351 en fragmentione met massas van onder andere 336, 321, 292, 261, 246, 231, 218, 203, 160, 153, 75 en 73. Die indoliese melanien metaboliet 6H5MIK is gesintetiseer volgens die metode beskryf onder punt 4.2.6(a) in hoofstuk 4. Die gesintetiseerde 6H5MI2K is gederivatiseer met BSTFA en TMCS en is geanaliseer deur middel van GC-MS soos beskryf is onder punt 4.2.6 (b) in hoofstuk 4. Figuur 6.20 toon die massaspektrum van die gesintetiseerde, gesilaneerde 6H5MI2K.



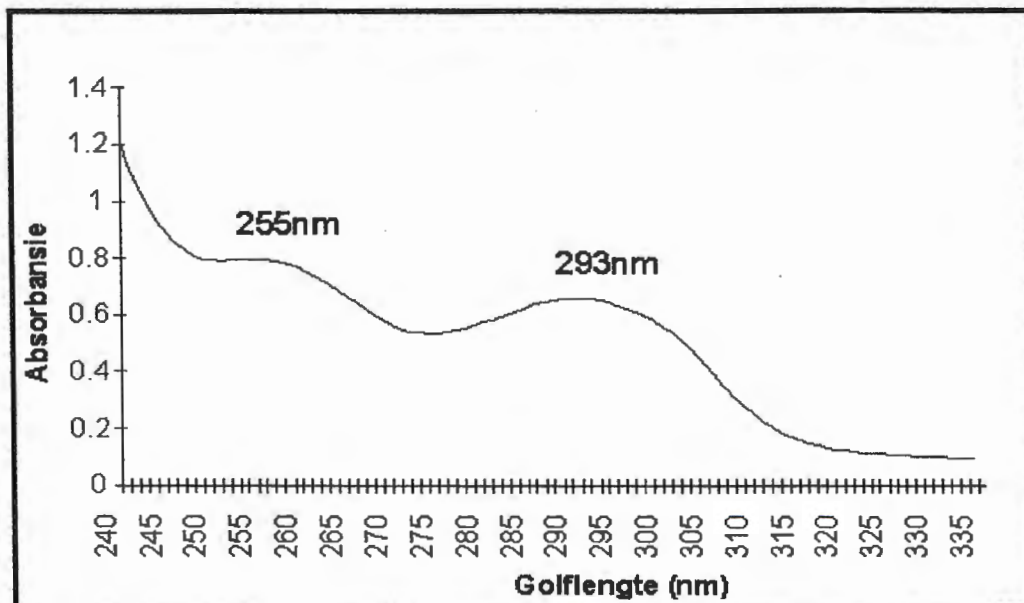
Figuur 6.20: Massaspektrum van die gesintetiseerde 6H5MI2K.

Dit is duidelik vanuit figuur 6.20 dat die massaspektrum van die gesintetiseerde 6H5MI2K ooreenstem met die massaspektrum wat verkry is deur Duthel & Vallon (1991) vir hierdie gesilaneerde verbinding.

6.2.5 Die sintese en suiwing van 5SSD



Figuur 6.21(a): Die aanvanklike absorpsiespektrum van die 5SSD sintetiese ensiemreaksiemengsel.



Figuur 6.21 (b) : Die absorpsiespektrum van die 5SSD sintetiese reaksiemengsel na verloop van die ensiemreaksie.

5SSD is ensiematies gesintetiseer volgens die sintetiese metode beskryf onder punt 4.2.7 (a) in hoofstuk 4. Figuur 6.21 toon hoedat die absorpsiespektrum van die ensiemreaksiemengsel verander het gedurende die ensiematiese 5SSD sintese. Dit is duidelik vanuit figuur 6.21 dat die aanvanklike absorpsiemaksimum van L-DOPA by 280 nm heeltemal vervang is deur maksima by 255 en 293 nm, die absorpsiemaksima van 5SSD (Ito & Prota, 1977).

Die produkte van sintese in die ensiemreaksiemengsel is gefraksioneer deur middel van HPLC met UV deteksie soos beskryf is onder punt 4.2.7 (b) in hoofstuk 4. Volgens Ito *et al.* (1984) elueer 5SSD by 'n retensietyd van 15.5 minute uit 'n C18 kolom (250 x 4.6 mm, 7 μ m deeltjiegrootte). Al die pieke in die suiweringsprofiel is apart gefraksioneer en die versamelde fraksies is gevriesdroog. Die gevriesdroogde versamelde fraksies van die grootste piek wat geëlueer het by 14 minute is geanaliseer deur middel van atmosferiese druk chemiese ionisasie massaspektrometrie soos beskryf is onder punt 4.2.7 (b) in hoofstuk 4. Die ES-MS analise van die gesuiwerde verbinding het getoon dat die verbinding 'n molekulêre massa van 316 het. Die molekulêre massa van 5SSD is 316.

6.2.6 Die kwantifisering van L-DOPA, DA en 5SSD in urienemonsters deur middel van HPLC met elektrochemiese deteksie

Die verbindings L-DOPA, DA en 5SSD kon sensitief waargeneem word deur middel van elektrochemiese deteksie volgens die metode beskryf onder punt 4.2.8 in hoofstuk 4. Die pieke van L-DOPA en DA het egter heelwat oorvleuel tot so 'n mate dat hierdie verbindings nie afsonderlik gekwantifiseer kon word nie. Verskeie wysiginge in die samestelling van die loopmiddel is aangebring om te poog om die pieke van hierdie twee verbindings te laat skei. So byvoorbeeld is die pH van die loopmiddel verhoog tot 2.8 of verlaag tot 2.2, maar hierdie wysiginge kon nie daarin slaag om die verbindings te laat skei nie.

Selfs deur die ionparingsreagens te verander van metaansulfoonsuur na heptaansulfoonsuur of oktaansulfoonsuur kon nie skeiding teweeg gebring word nie. Deur die kolomtemperatuur te verlaag na 28°C is geslaag daarin om die pieke van L-DOPA en DA te laat skei. Ander ongeïdentifiseerde verbindings aan die begin van die chromatografiese profiel van urinêre ekstrakte het egter baie ooreenkomstigheid met die DA en L-DOPA piek.

Weens die skeidingsprobleme wat ondervind is met hierdie tegniek is besluit om van ander tegnieke gebruik te maak vir die kwantifisering van L-DOPA, DA, 5SSD en OMD in urienemonsters.

6.2.7 Die kwantifisering van melaniënverwante metaboliete in urine deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie

6.2.7(a) Optimalisering van die kondisies vir die elektrospoei-massaspektrometriese waarneming van L-DOPA, DA, 5SSD, OMD en α -metioldopa (interne standaard)

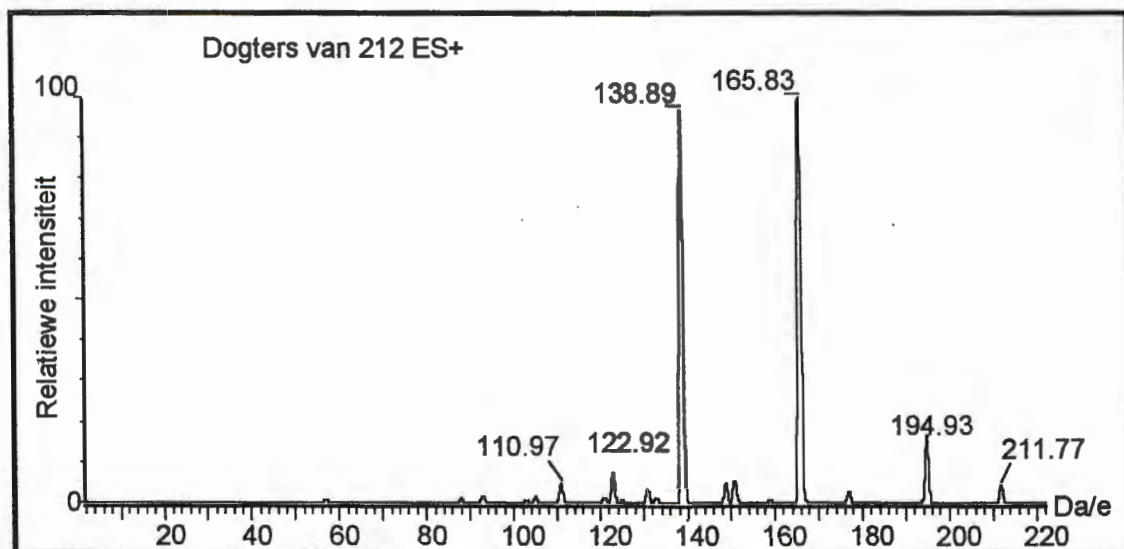
Voordat die verbindings in die urine van die pasiënt gekwantifiseer kon word moes eers vasgestel word by watter massaspektrometriese kondisies hierdie verbindings die beste waargeneem sou kon word. Deur die keëlspanning en die botsingsenergie stelselmatig te wysig kon vasgestel word by watter kondisies die moederioon van elke verbinding waargeneem word en ook by watter kondisies fragmentasie tot so 'n mate plaasvind dat duidelike fragmente waargeneem kon word. Die wyse waarop die massaspektrometriese kondisies geoptimaliseer is, is beskryf onder punt 4.2.9 (a) in hoofstuk 4.

Die molekulêre massa van α -metioldopa is 211 g/mol. Na ionisasie tydens elektrospoei-massaspektrometrie van α -metioldopa is die M^{+1} (moederioon + 1 m/z) as 212 geregistreer.

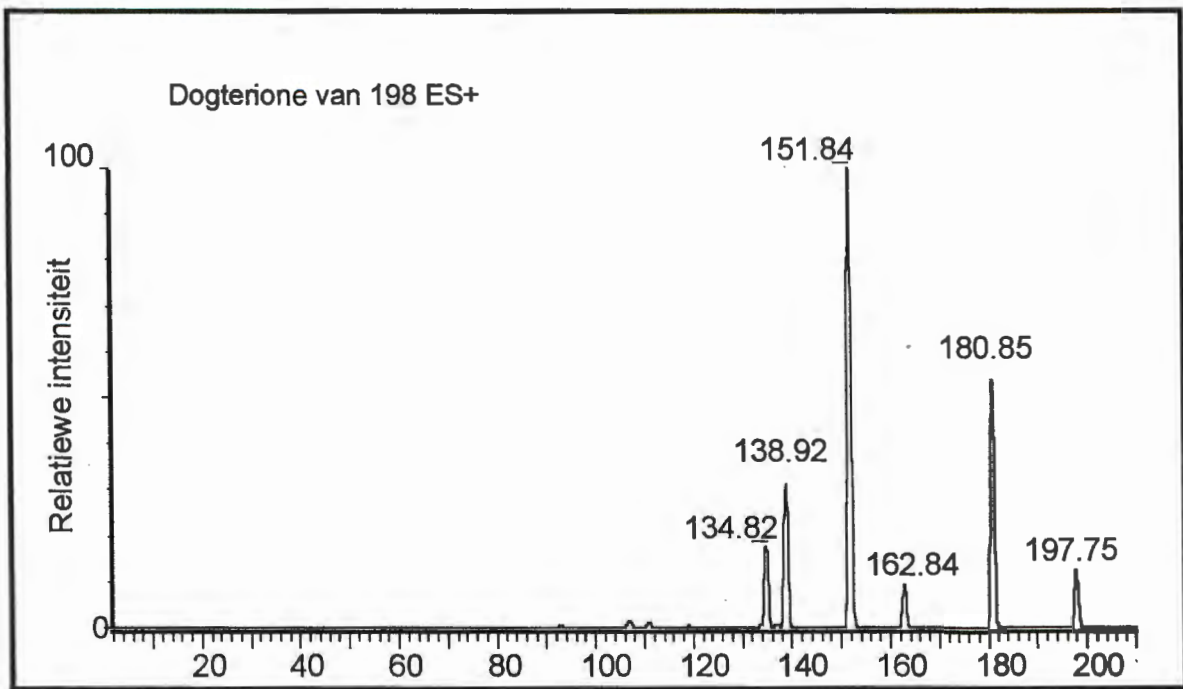
Vanuit figuur 6.22 is dit duidelik dat die hoof dogterione van α -metioldopa na fragmentasie van die verbinding tydens elektrospoei-massaspektrometrie massas van 195, 166 en 139 gehad het.

Die molekulêre massa van L-DOPA is 197 g/mol. Na ionisasie tydens elektrospoei-massaspektrometrie van L-DOPA is die M^{+1} (moederioon + 1 m/z) as 198 geregistreer. Vanuit figuur 6.23 is dit duidelik dat die hoofdogterione van L-DOPA na fragmentasie gedurende elektrospoei-massaspektrometrie massas van 152 en 181 getoon het.

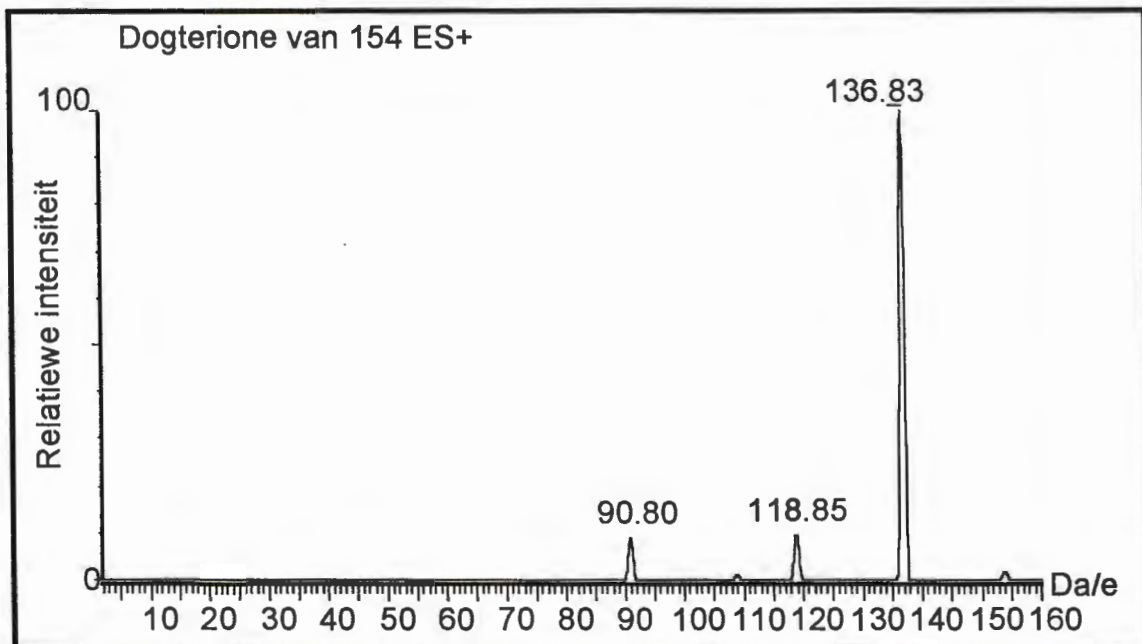
DA het 'n molekulêre massa van 153 g/mol. Na ionisasie tydens elektrospoei-massaspektrometrie van DA is die M^{+1} (moederioon + 1 m/z) as 154 geregistreer. Vanuit figuur 6.24 is dit duidelik dat die hoof dogterioon van DA na fragmentasie deur elektrospoei-massaspektrometrie 'n massa van 137 gehad het.



Figuur 6.22: Dogterioon skanderingsprofiel van α -metioldopa.



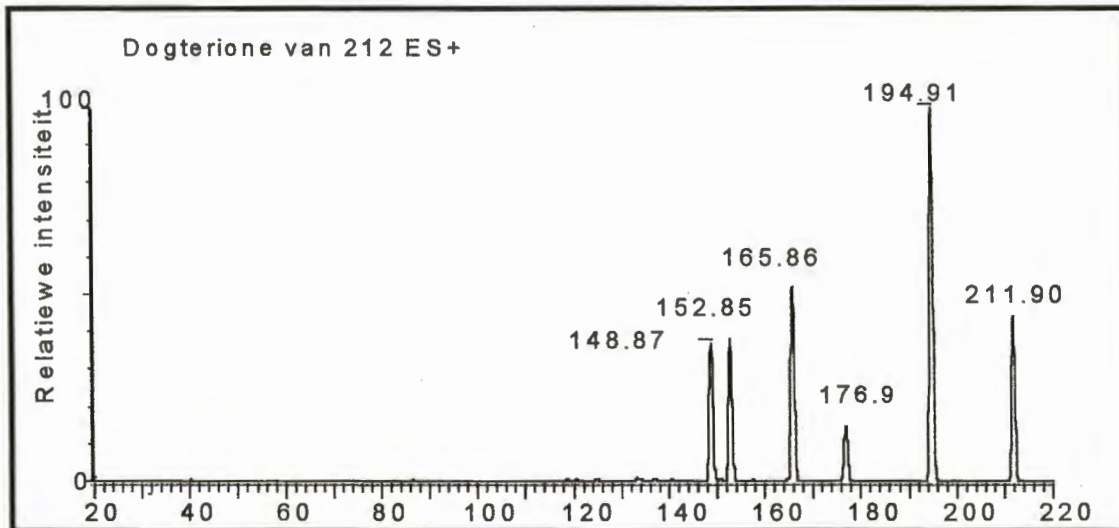
Figuur 6.23: Dogterioon skanderingsprofiel van L-DOPA.



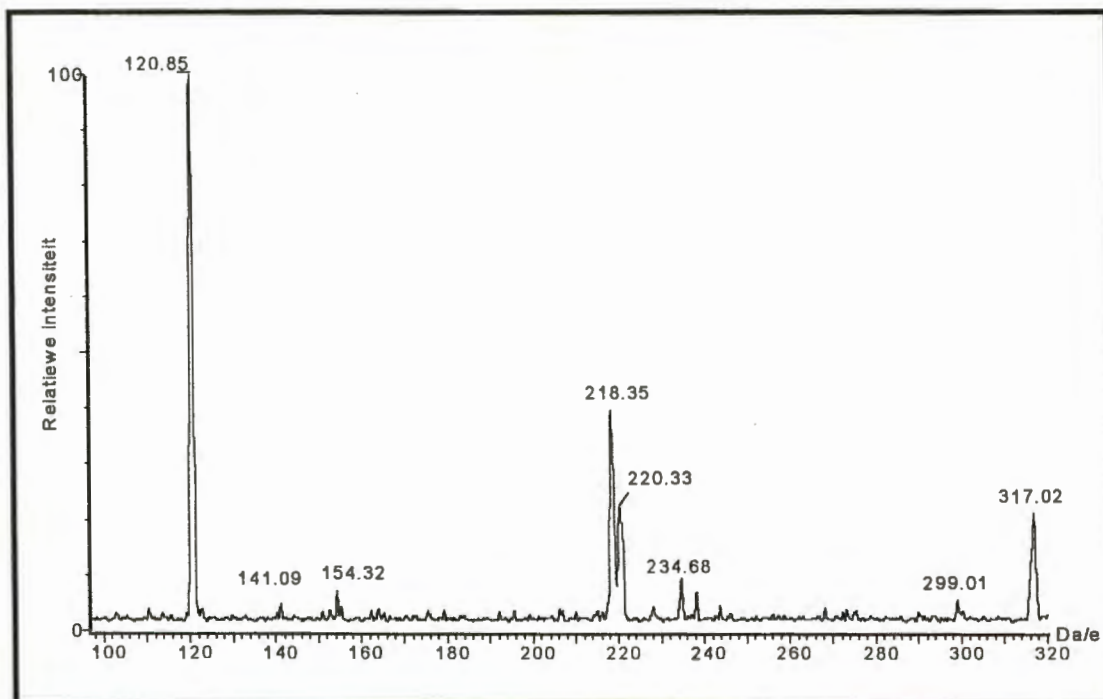
Figuur 6.24: Dogterioon skanderingsprofiel van DA.

OMD, een van die hoof metaboliete van Sinemet medikasie, het 'n molekulêre massa van 211 g/mol. Na ionisasie tydens elektrospoei-massaspektrometrie van OMD is die M^{+1} (moederioon + 1 m/z) as 212

geregistreer. Vanuit figuur 6.25 is dit duidelijk dat die hoof dogterione van OMD na elektrospoei- massaspektrometrie massas van 195, 177, 166, 153 en 149 het.



Figuur 6.25: Dogterioon skanderingsprofiel van OMD.



Figuur 6.26: Dogterioon skanderingsprofiel van 5SSD.

Die molekulêre massa van 5SSD is 316 g/mol. Figuur 6.26 toon dat die hoof dogterioon wat verkry is wanneer die ensiematiese gesintetiseerde 5SSD gefragmenteer is deur elektrospoei-massaspektrometrie 'n m/z waarde van 121 het.

Ten einde die verbindings L-DOPA, DA, OMD en 5SSD in die uriene van die pasiënt te kwantifiseer, is geskandeer vir die spesifieke moederioon en 'n dogterioon van elk van hierdie verbindings in die uriene-ekstrakte. Die onderstaande tabel 6.1 toon die ione waarvoor geskandeer is vir die kwantifisering van elke verbinding.

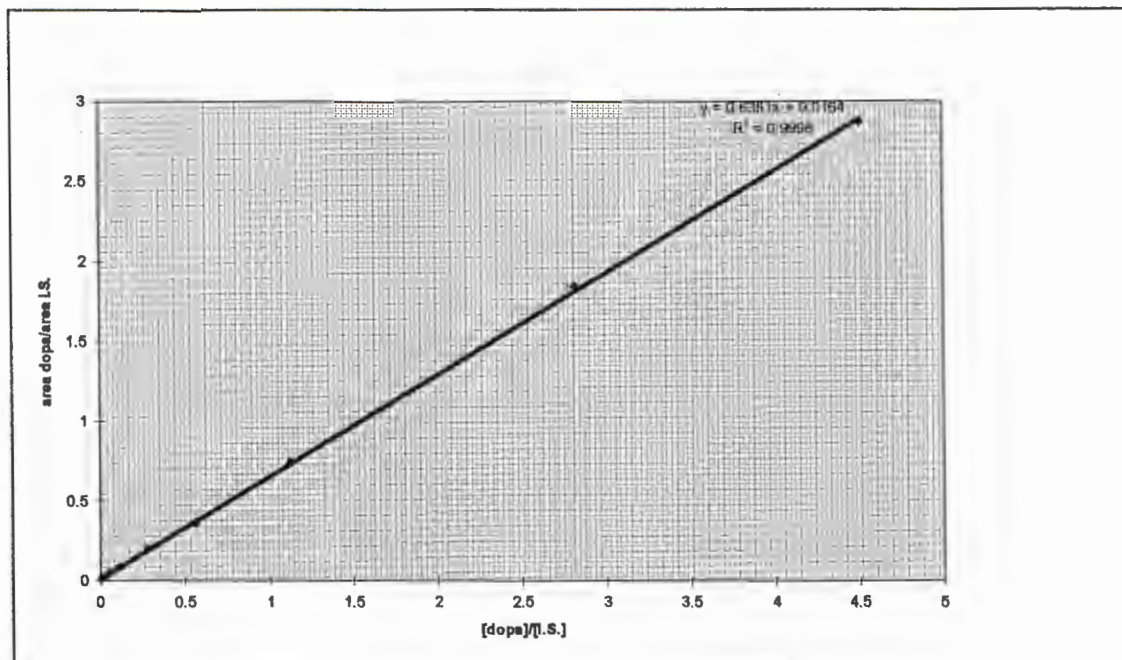
Tabel 6.1: Ione waarvoor geskandeer is vir die kwantifisering van L-DOPA, DA, 5SSD en OMD in uriene.

Verbinding	Moederioon	Dogterioon
α -metioldopa	212	139
OMD	212	153
L-DOPA	198	152
DA	154	137
5SSD	317	121

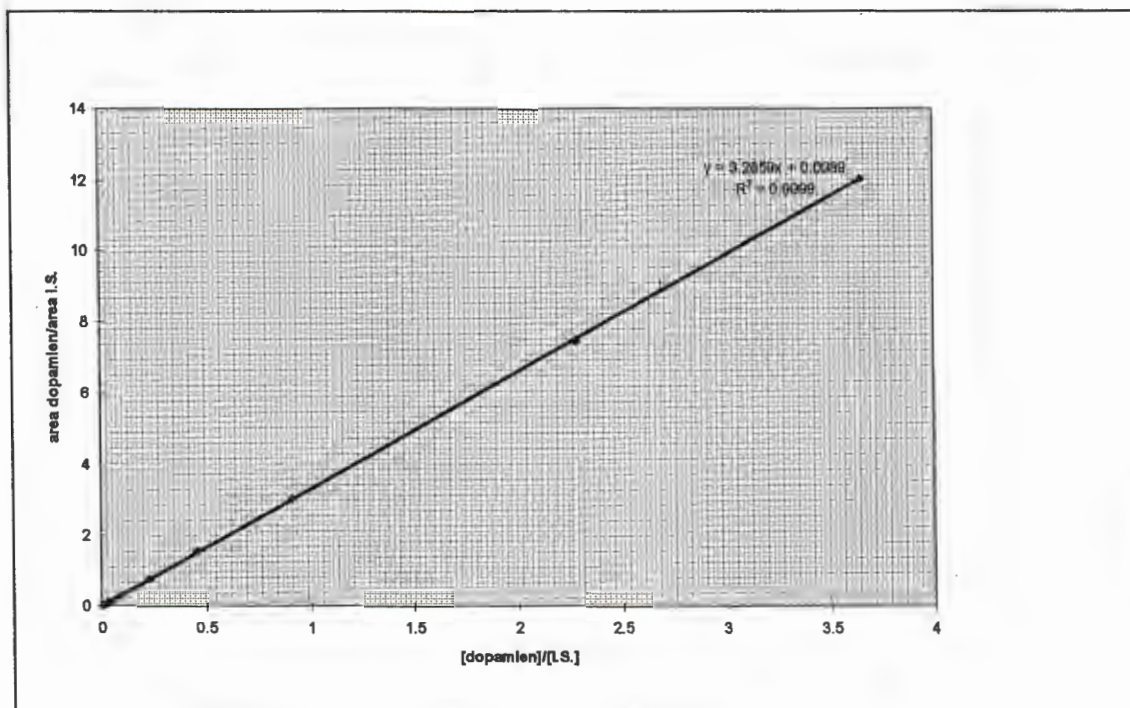
Aangesien α -metioldopa en OMD dieselfde molekulêre massa het en sommige van die dogterione van hierdie twee verbindings ook ooreenstem in massa, moes die dogterioon waarvoor vir elk geskandeer is versigtig gekies word. Aangesien beide die 195 en 166 dogterioon gemeenskaplik is aan die twee verbindings, is daar nie geskandeer vir hierdie twee ione vir die kwantifisering van α -metioldopa en OMD nie.

Standaardkonsentrasiereekse van elk van die verbindings wat gekwantifiseer moes word is opgestel om uiteindelik 'n standaardkurwe vir elke verbinding te kon trek. Hierdie standaardkurwes is dan gebruik vir die kwantifisering van die verbindings. Figuur 6.27 toon die standaardkurwes wat verkry is vir L-DOPA, DA en OMD. Vanuit figuur 6.27 is dit duidelik dat reglynige

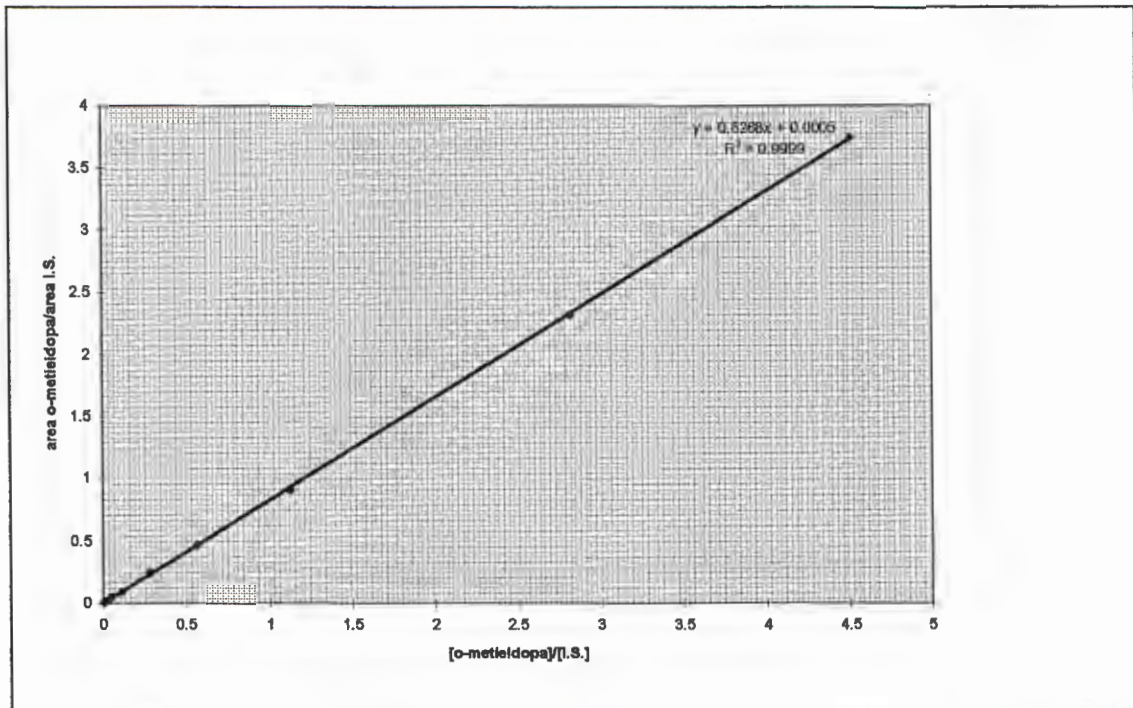
standaardkurwes verkry is vir L-DOPA, DA en OMD. Die standaardkurwes toon almal uitstekende liniêre regressiekoeffisiënte.



Figuur 6.27(a) : Standaardkurwe van L-DOPA.



Figuur 6.27(b): Standaardkurwe van DA.



Figuur 6.27(c): Standaardkurwe van OMD.

Die konsentrasie van 5SSD in oplossing na die sintese en suiwing van hierdie verbinding was nie bekend nie. Om hierdie rede kon 'n standaardkurwe vir hierdie verbinding nie saamgestel word nie. Hierdie verbinding kon dus slegs gekwantifiseer word relatief tot die interne standaard volgens die formule:

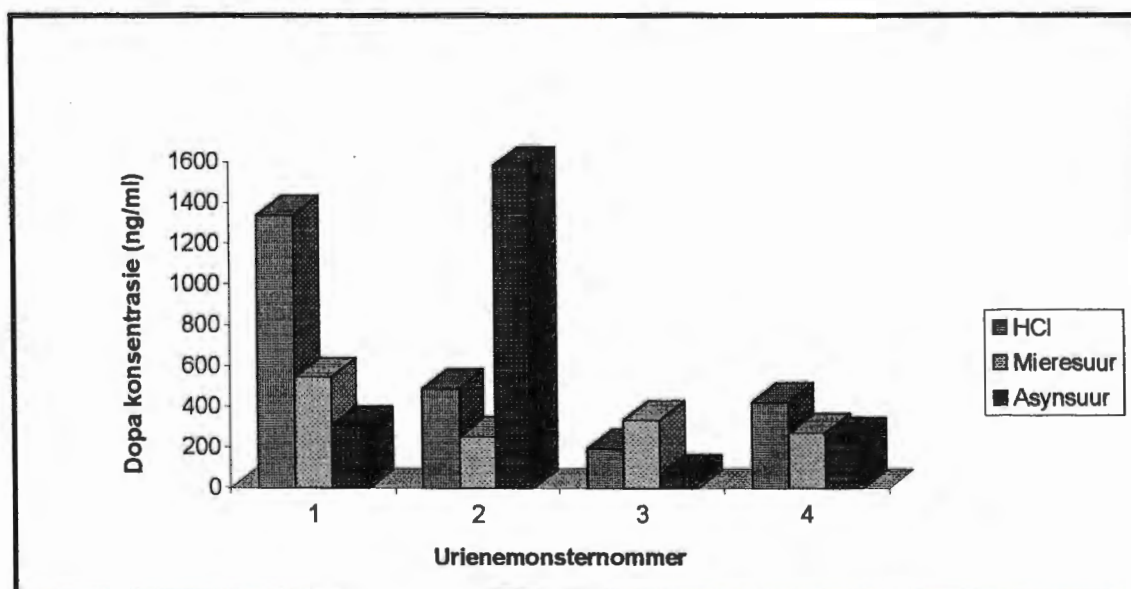
$$[x] = \text{area } x \cdot [\text{I.S.}] / \text{area I.S.}$$

waar [x] en [I.S.] verwys na die konsentrasie van 5SSD en die interne standaard onderskeidelik en area x en area I.S. verwys na die area onder die piek van die karakteristieke moederioon waarvoor geskandeer is van 5SSD en die interne standaard onderskeidelik.

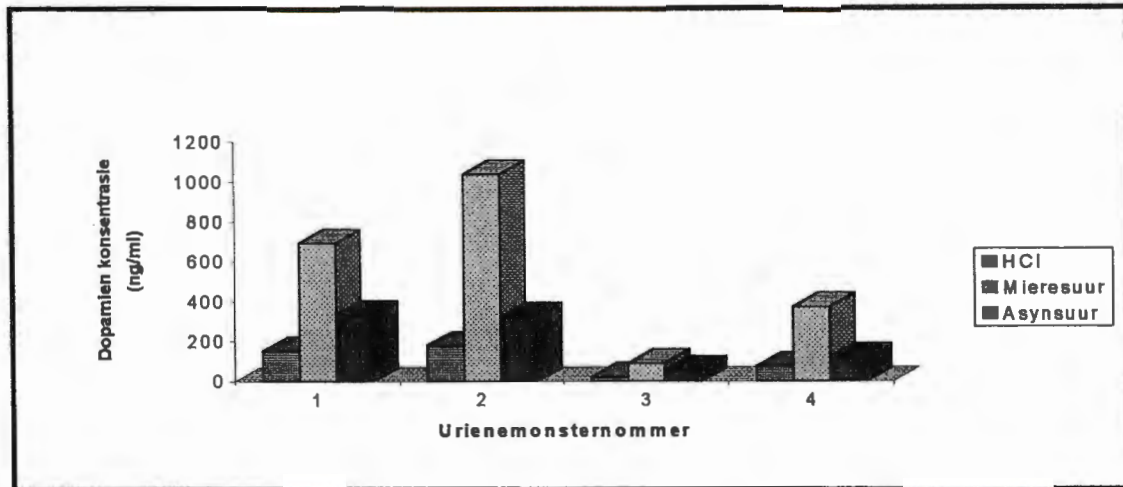
6.2.7(b) Kwantifisering van melaniënverwante metaboliete in uriene na alumina ekstraksie

Nadat die verbindings uit die uriene van die pasiënt geëkstraheer en gedroog is volgens die alumina ekstraksiemetode beskryf onder punt 4.2.9 (b), is die ekstrakte geanaliseer deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie.

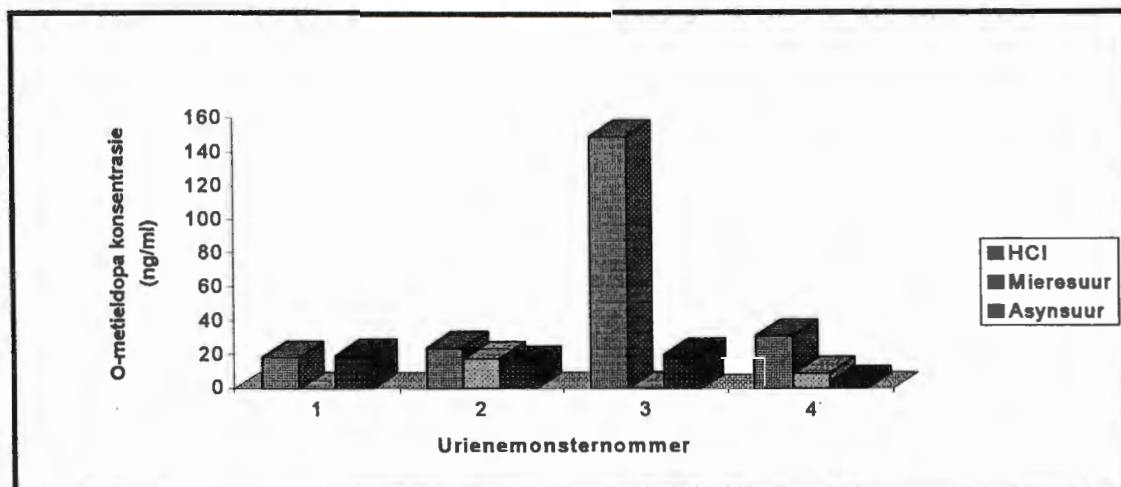
Die grafieke in figuur 6.28 toon resultate wat verkry is deur OMD, L-DOPA en DA uit vier urienemonsters van die pasiënt te ekstraheer met α -metioldopa as interne standaard en te kwantifiseer deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie. Die grafieke toon ook die verskil in resultate wanneer verskillende suuragtige oplossings gebruik is om die verbindings vanaf alumina te elueer. Vanuit figuur 6.28 is dit duidelik dat L-DOPA, DA en OMD konsentrasies wat baie van mekaar verskil verkry is vir elke urienemonster wanneer verskillende suuroplossings gebruik is vir eluering. Hierdie verskille in konsentrasie het voorgekom ten spyte van die feit dat 'n interne standaard, α -metioldopa, gebruik is.



Figuur 6.28(a): Die ekstraksie van L-DOPA uit urienemonsters deur middel van alumina.



Figuur 6.28(b) : Die ekstraksie van DA uit urienemonsters deur middel van alumina.



Figuur 6.28(c): Die ekstraksie van OMD uit urienemonsters deur middel van alumina.

Geen verbinding met 'n moederioon van 317 en 'n dogterioon van 121 is opgemerk in enige van die alumina ekstrakte vanuit die uriene van die pasiënt nie. Die gesintetiseerde 5SSD standaard is ook geëkstraheer deur middel van alumina vanuit die HPLC suiweringssloopmiddel. Weereens kon geen 5SSD opgemerk word in die ekstrakte nie.

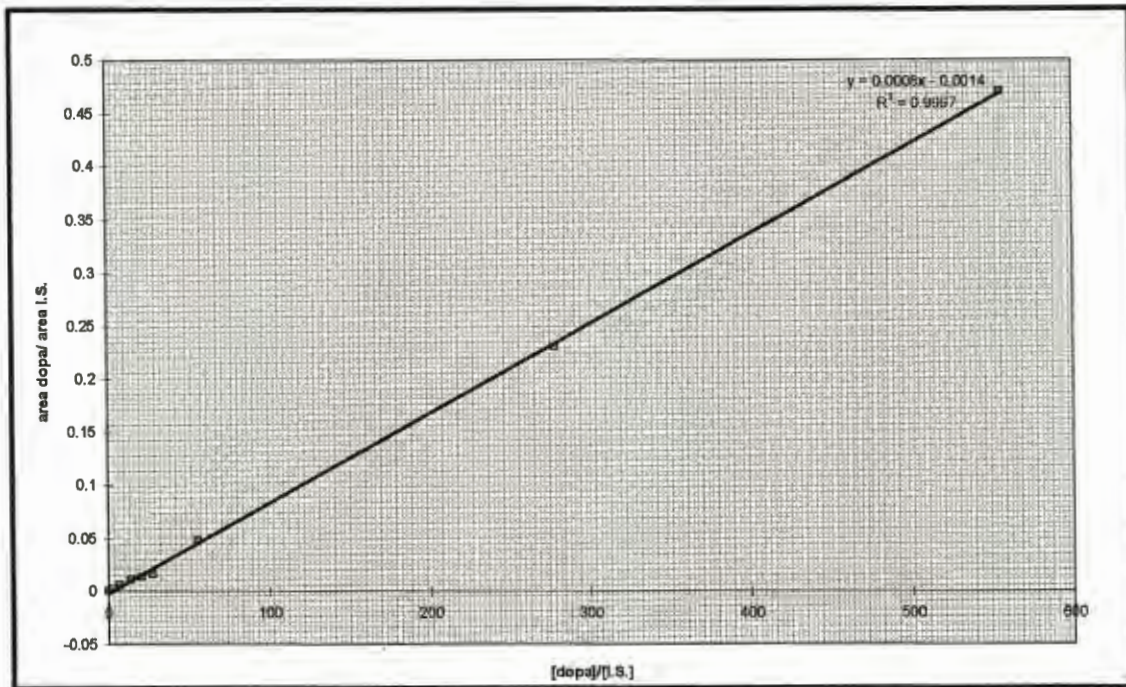
Die groot wisseling in konsentrasies na eluering met verskillende suuragtige oplossings, ten spyte van die gebruik van 'n interne standaard, is duidelik uit figure 6.28 (a) tot (c). Hierdie verskynsel lei daartoe dat kwantifisering na alumina ekstraksie nie herhaalbaar of betroubaar is nie. Weens hierdie feit en die probleme wat ondervind is met die waarneming van 5SSD na alumina

ekstraksie, is besluit om die ekstraksie-stap te omseil volgens die metode wat gebruik maak van derivatisering met butanoliese HCl beskryf onder punt 4.2.9 (d) in hoofstuk 4.

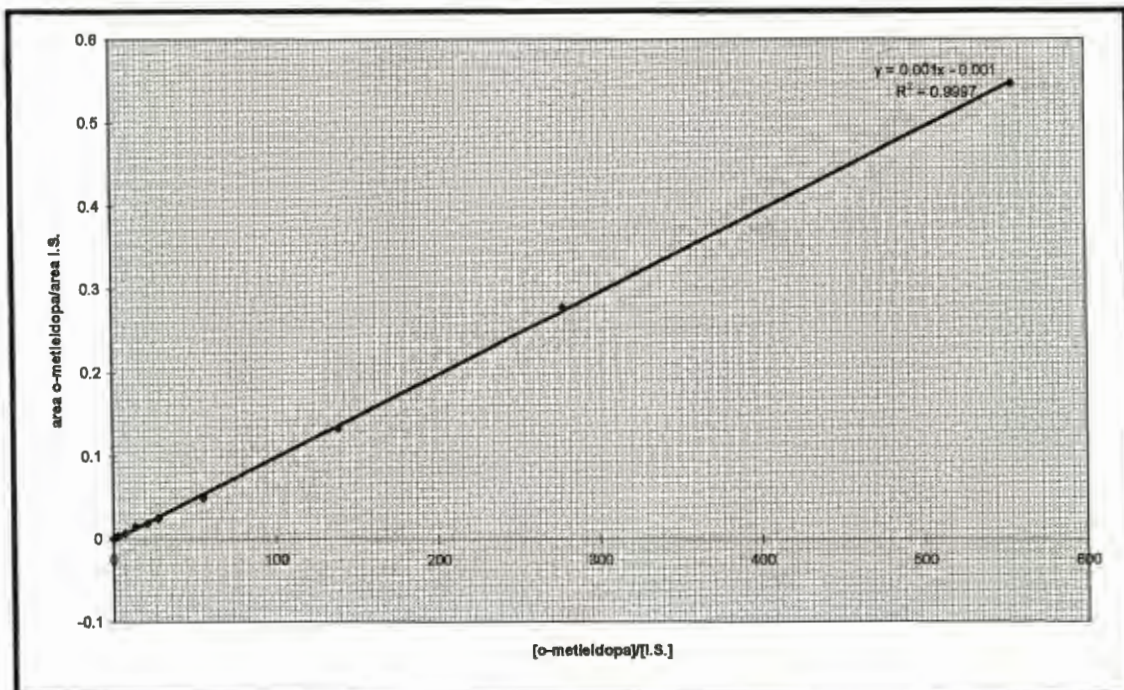
6.2.7(c) Kwantifisering van melaniënverwante metaboliete in urienemonsters na derivatisering met butanoliese HCl

Die molekulêre massa van die gebutieleerde derivaat van L-DOPA is 253 g/mol, dié van OMD is 267 en dié van die interne standaard, D₁₀-isoleusien, is 197. Na ionisasie van die verbindings tydens elektrospoei-massaspektrometrie is die moederione van L-DOPA, OMD en D₁₀-isoleusien by m/z 254, 268 en 198 onderskeidelik geregistreer. DA butieleer nie aangesien dit nie 'n karboksielgroep besit nie en het dus na butielering steeds 'n massa van 153 en na ionisasie tydens elektrospoei-massaspektrometrie is die M⁺ ion aangetoon by m/z 154.

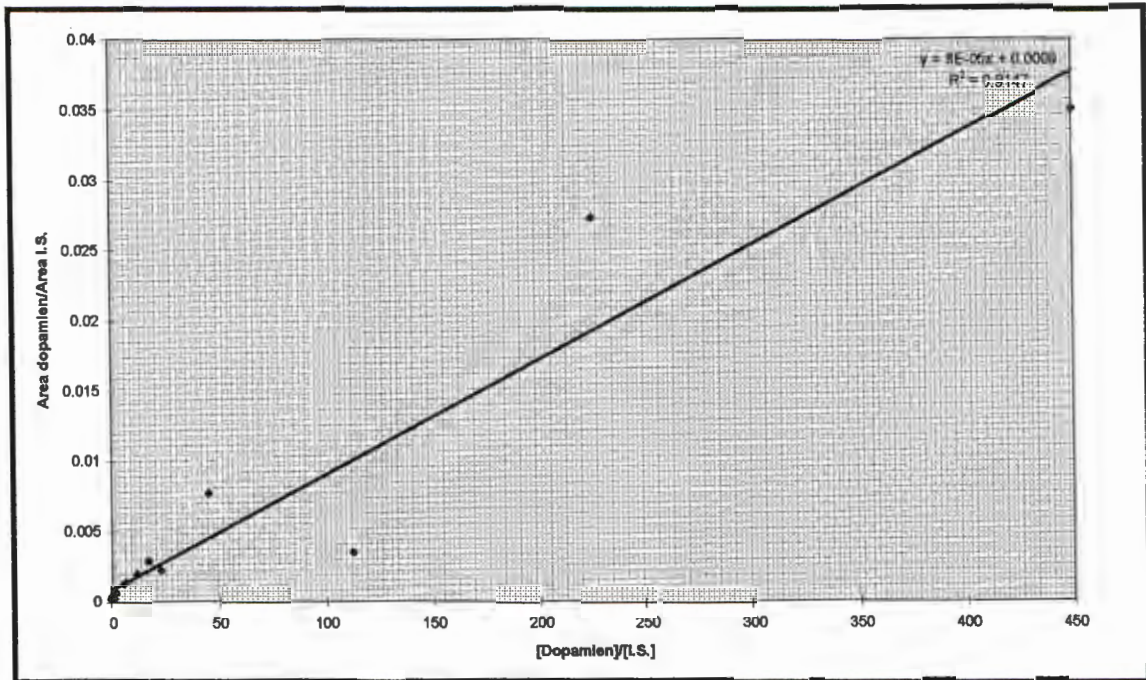
Figuur 6.29 toon die standaardkurwes wat verkry is vir L-DOPA, DA en OMD. Vanuit figuur 6.29 (c) is dit duidelik dat die DA standaardkurwe relatief tot dié van L-DOPA en OMD 'n swakker liniêre regressiekoeffisiënt getoon het, alhoewel L-DOPA, DA en OMD aan dieselfde derivatiseringskondisies blootgestel is. Om hierdie rede is besluit om 'n beter liniêre regressiekoeffisiënt vir die DA standaardkurwe te verkry deur standaard DA konsentrasies eerder voor te berei volgens die metode beskryf onder punt 4.2.9 (e) in hoofstuk 4. Urienemonsters is ook voorberei volgens bogenoemde metode vir die kwantifisering van DA.



Figuur 6.29(a) : Die standaardkurve van L-DOPA.



Figuur 6.29(b) : Die standaardkurve van OMD.



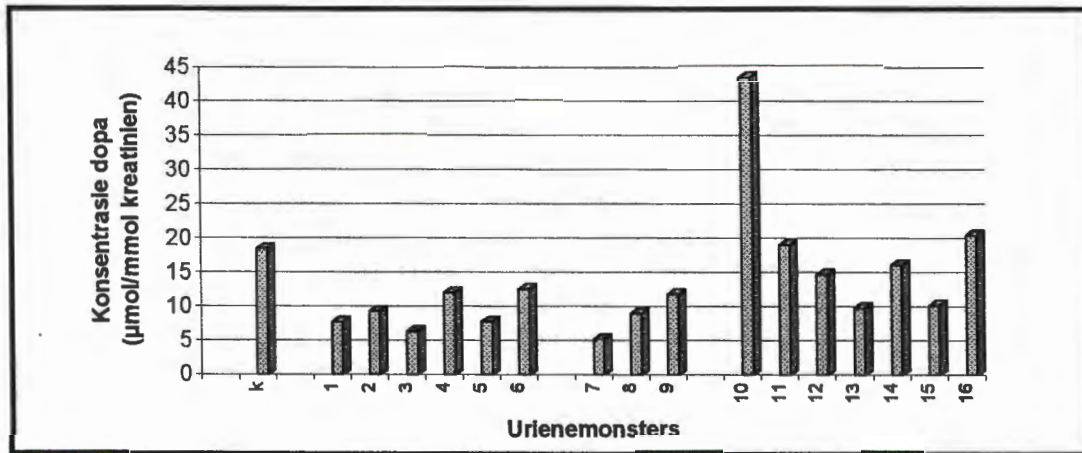
Figuur 6.29(c) : Die standaardkurwe van DA.

Aangesien die konsentrasie 5SSD en 6H5MIK in oplossing na die suiwing van hierdie verbindinge nie bekend was nie, kon standaardkurwes vir hierdie verbindinge nie saamgestel word nie. Hierdie verbindinge is dus slegs relatief tot die interne standaard, D₁₀-isoleusien, gekwantifiseer.

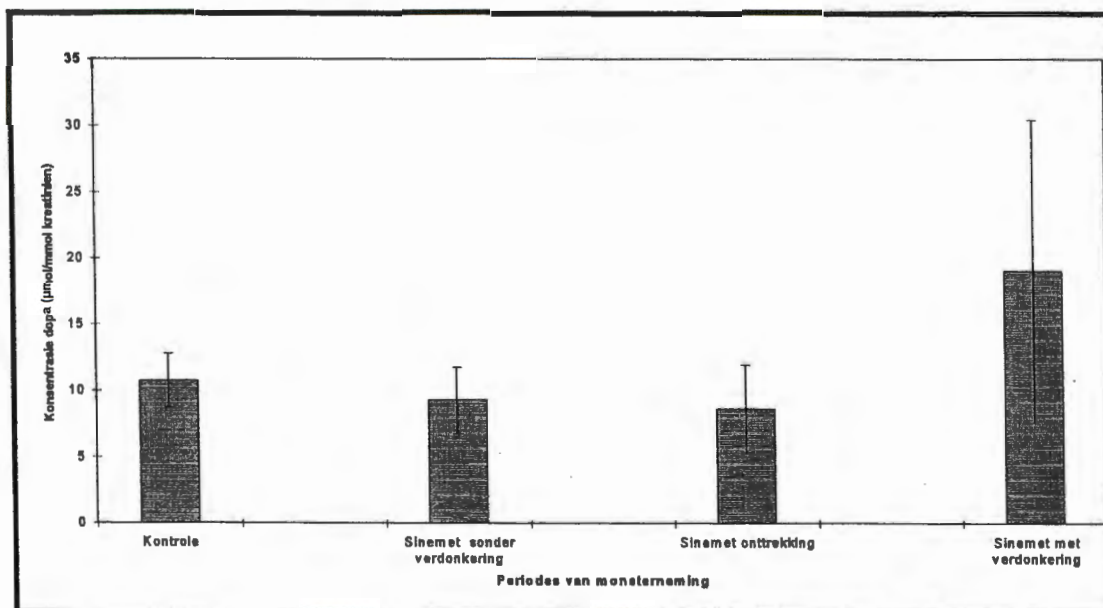
Figuur 6.30 en 6.31 toon die konsentrasies van L-DOPA en OMD wat voorgekom het in die urienemonsters van die pasiënt soos bepaal deur ES-MS na derivatisering met butanoliese HCl.

K in figuur 6.30 en figuur 6.31 dui die gemiddelde konsentrasie van L-DOPA en OMD onderskeidelik in kontrole urienemonsters (n=2) aan soos bepaal deur hierdie metode. Monster 1 tot 6 is geneem gedurende tye dat die pasiënt Sinemet behandeling ontvang het, maar geen verdonkering van liggaamsvloeistowwe plaasgevind het nie. Monsters 7 tot 9 is geneem gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is. Monsters 10 tot 16 is geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is en liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het. Figuur 6.30 (b) gee 'n

opsomming van die data weergegee in figuur 6.30 (a). Figuur 6.31 (b) gee 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.31 (a).



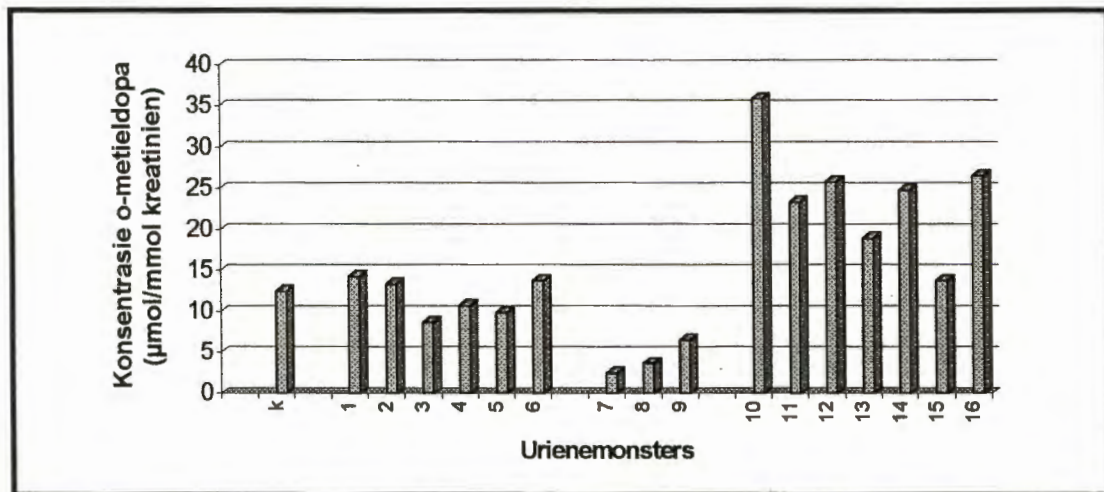
Figuur 6.30(a): Die konsentrasies van L-DOPA in die urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone.



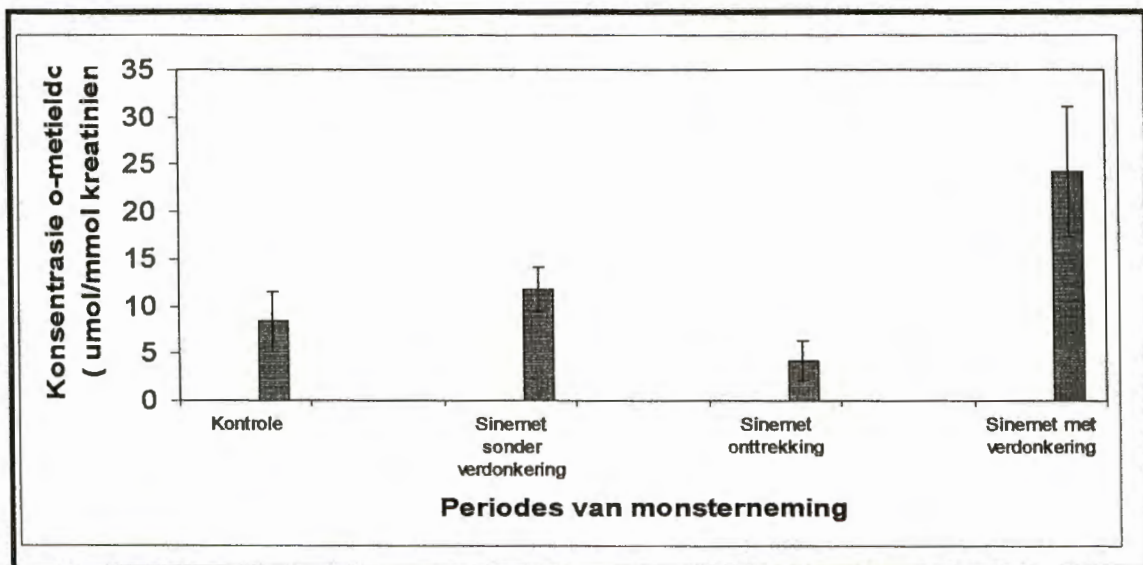
Figuur 6.30(b): Die gemiddelde konsentrasie L-DOPA in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

Vanuit figuur 6.30 (a) en (b) is dit duidelik dat die konsentrasie L-DOPA in meeste van die urienemonsters geneem gedurende tye van verdonkering hoër is as die L-DOPA konsentrasie in monsters wat nie afkomstig is van tye van verdonkering nie. Die L-DOPA konsentrasie toon 'n verlaging gedurende

tye dat die Sinemet dosis verlaag is. Die konsentrasie van L-DOPA in die uriene van die pasiënt terwyl sy met Sinemet behandel word stem ooreen met die L-DOPA konsentrasies in kontrole uriemonsters bepaal volgens hierdie metode.



Figuur 6.31(a): Die OMD konsentrasies in uriemonsters van die pasiënt en kontrolepersone.



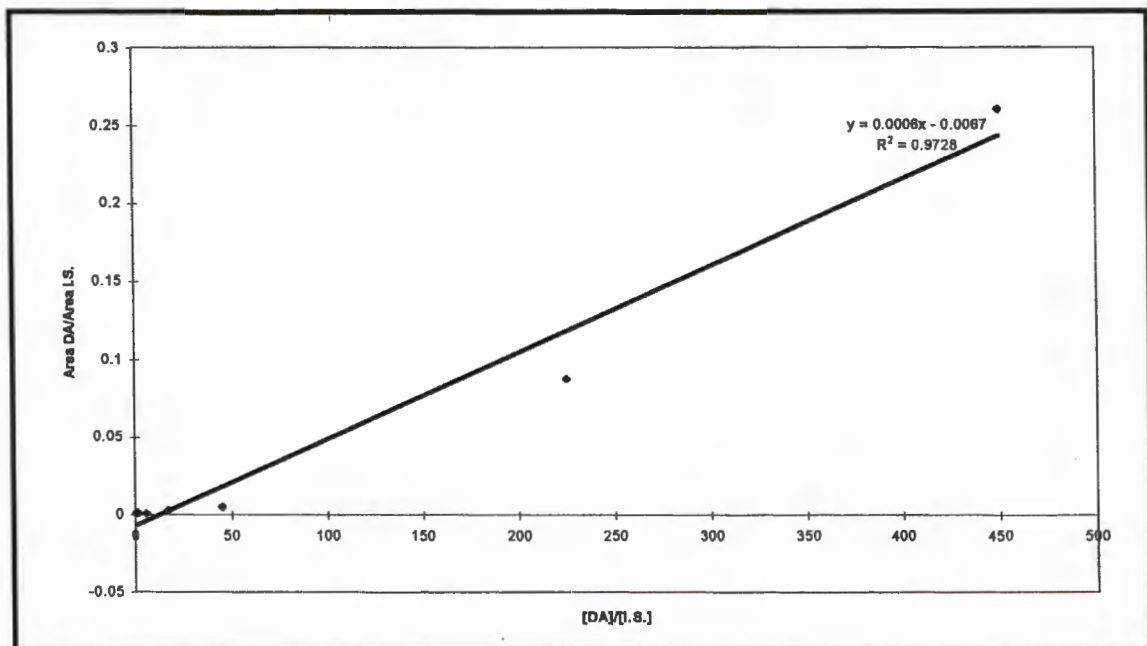
Figuur 6.31(b): Die gemiddelde konsentrasies OMD in uriemonsters van die pasiënt geneem gedurende spesifieke tydperke.

Vanuit figuur 6.31(a) en (b) is dit duidelik dat OMD duidelik heelwat verhoog is in uriemonsters afkomstig van tye dat liggaamsvloeistofverdonkering

plaasgevind het in vergelyking met tye dat verdonkering nie plaasgevind het terwyl die pasiënt met Sinemet behandel is nie. Die OMD konsentrasie toon 'n duidelike verlaging gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is. Die konsentrasie OMD in die uriene van die pasiënt gedurende tye dat sy met Sinemet behandel is sonder liggaamsvloeistofverdonkering, stem ooreen met die OMD konsentrasie in kontrole urienemonsters wat volgens dieselfde metode gekwantifiseer is.

6.2.7(d) Die kwantifisering van DA, 5SSD en 6H5MIK in urienemonsters na droging en butielering by minder drastiese kondisies

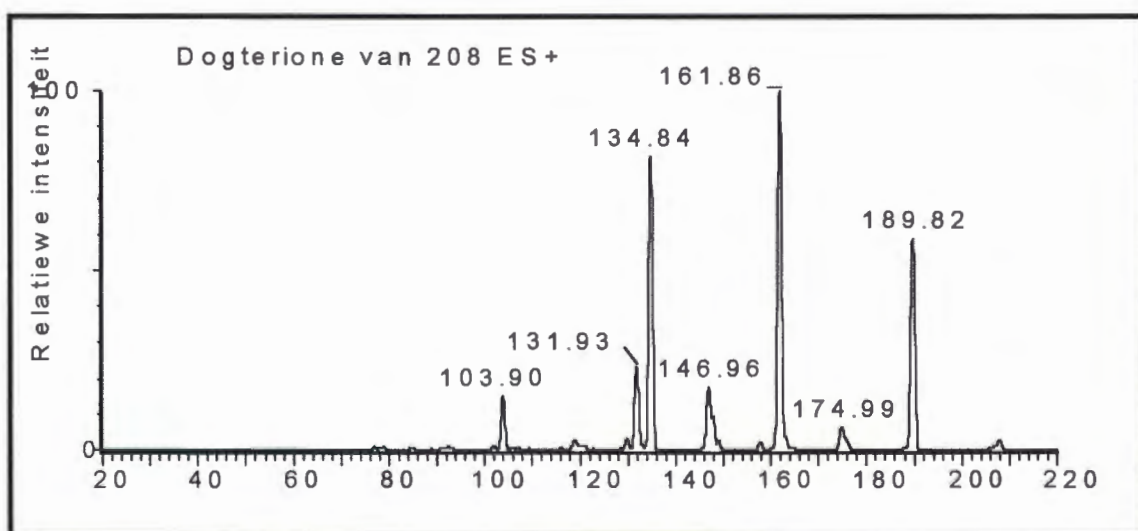
Ten einde 'n beter liniêre regressiekoëffisiënt te verkry vir die DA standaardkurwe is standaardkonsentrasies DA voorberei vir massaspektrometrie volgens die metode beskryf onder punt 4.2.9 (e) in hoofstuk 4. Figuur 6.32 toon die DA standaardkurwe wat verkry is volgens bogenoemde metode.



Figuur 6.32 : DA standaardkurwe

Vanuit figuur 6.32 is dit duidelik dat 'n beter liniêre regressiewaarde verkry is vir die DA standaardkurwe wanneer DA standaardkonsentrasies voorberei is volgens die metode beskryf onder punt 4.2.9 (e) in hoofstuk 4. Swakker liniêre regressiekoëffisiëntwaardes is verkry vir die L-DOPA en OMD standaardkurwes wanneer die standaardkonsentrasies van L-DOPA en OMD voorberei is volgens die bogenoemde gewysigde metode.

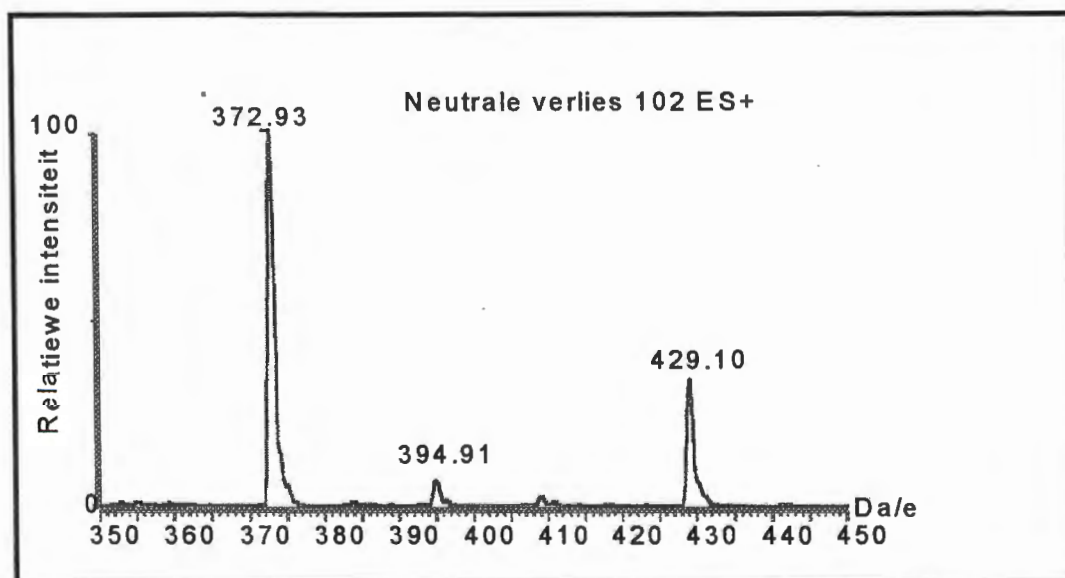
Aangesien 6H5MIK en 5SSD labiele verbindings is, is besluit om standarde van hierdie verbindings voor te berei vir massaspektrometrie volgens die minder drastiese metode beskryf onder punt 4.2.9 (e) in hoofstuk 4. Die gesintetiseerde standaard van 6H5MIK is voorberei volgens bogenoemde metode en is geanaliseer deur middel van elektrospoei-massaspektrometrie. 6H5MI2K het 'n massa van 207 en aangesien dit 'n karboksielgroep besit is 'n massa van 264 verwag na butielering en ionisasie tydens massaspektrometrie. In teenstelling met hierdie verwagte massa is 'n M^{+1} (moederioon + 1 m/z) met 'n massa van 208 ooreenstemmend met dié van ongederivatiseerde 6H5MI2K na ionisasie tydens massaspektrometrie geregistreer. Dit het aangedui dat 6H5MI2K dus nie gebutieleer het nie. Figuur 6.33 toon die massaspektrum wat verkry is van 6H5MI2K na derivatisering van hierdie verbinding met butanoliese HCl.



Figuur 6.33 : Dogterioon skanderingsprofiel van 6H5MI2K na derivatisering

Ten einde 6H5MIK te kwantifiseer in die urienemonsters is geskandeer vir die M^{+1} -ioon met 'n m/z waarde van 208 en vir die dogterioon met 'n m/z waarde van 162.

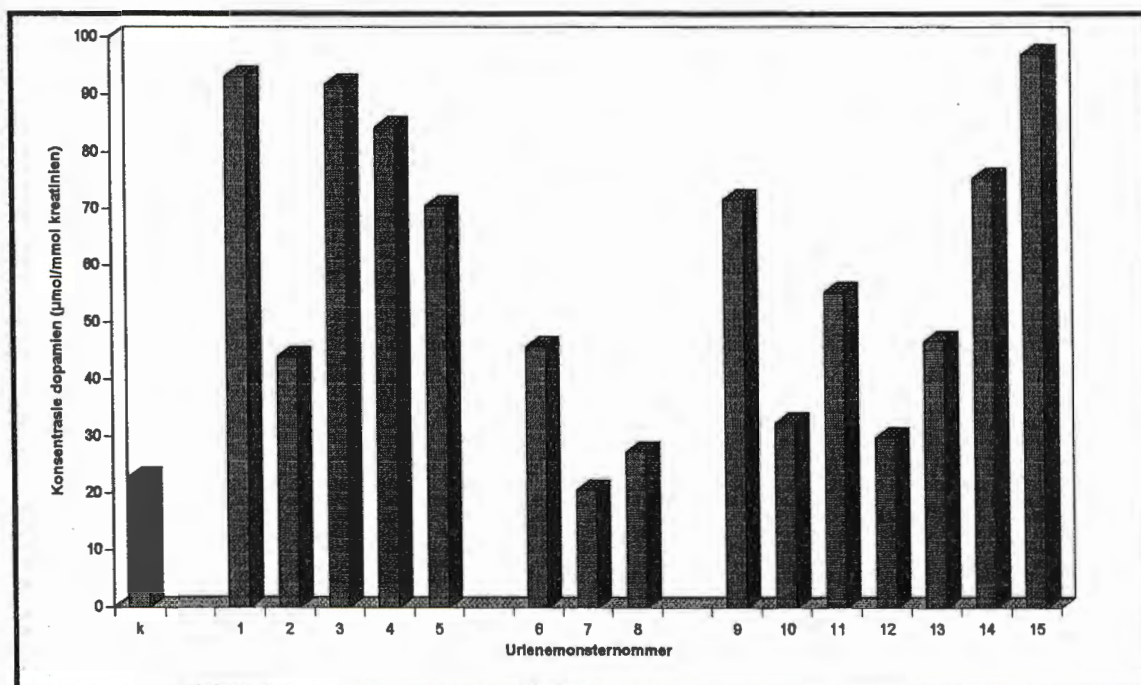
Die gesintetiseerde 5SSD standaard is ook gebutieleer. Die verwagte molekulêre massa van hierdie verbinding na butielering was 428 indien albei karboksielgroepe derivatiseer en 372 indien slegs een van die twee karboksielgroepe butieleer. Dus sal die enkelgebutieleerde 5SSD 'n massa van 373 hê na ionisasie en die dubbelgebutieleerde verbinding 'n massa van 429. Figuur 6.34 toon die massaspektrum van gebutieleerde 5SSD. Vanuit figuur 6.34 is dit duidelik dat meer enkelgebutieleerde 5SSD waarneembaar was as dubbelgebutieleerde 5SSD. Om hierdie rede is dus geskandeer vir 'n massa van 373 ten einde 5SSD in urienemonsters te kwantifiseer. Volgens die piekarea verhouding van die 373 en 429 ione in figuur 6.34 verteenwoordig die konsentrasie van die 373 ioon slegs 78.5 % van die totale konsentrasie 5SSD in 'n gederivatiseerde monster. Hierdie verhouding is in aanmerking geneem in die berekening van die 5SSD konsentrasie in urienemonsters.



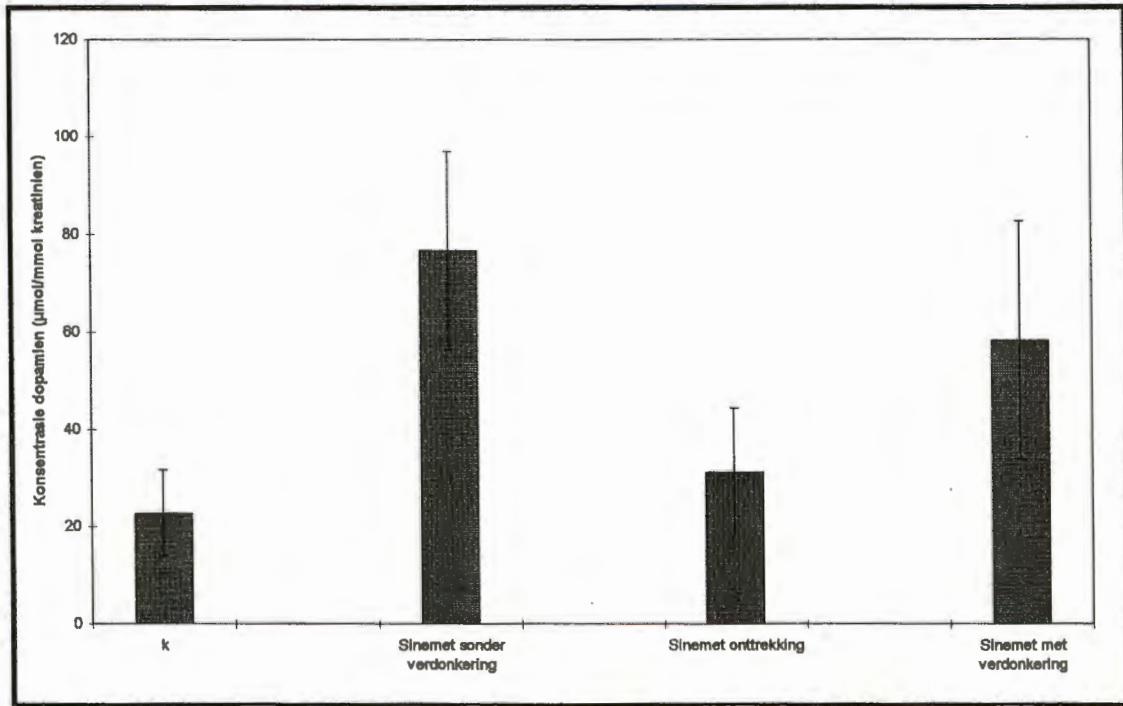
Figuur 6.34 Massaspektrum van gebutieleerde 5SSD

Ten einde DA, 5SSD en 6H5MIK in urienemonsters te kwantifiseer is urienemonsters voorberei vir massaspektrometrie volgens die minder drastiese voorbereidingsmetode beskryf onder punt 4.2.9 (e), aangesien hierdie metode 'n beter liniêre regressiewaarde vir die DA standaardkurwe gelewer het en 5SSD en 6H5MIK labiele verbindings is.

Figure 6.35 tot 6.37 toon die resultate wat verkry is vir die kwantifisering van DA, 5SSD en 6H5MIK in die urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone. K in figuur 6.35 (a), 6.36 (a) en 6.37 (a) dui onderskeidelik die gemiddelde konsentrasie DA, 5SSD en 6H5MIK in kontrole-urienemonsters (n=4) soos bepaal deur hierdie metode aan. Monster 1 tot 5 is geneem gedurende tye dat die pasiënt Sinemet behandeling ontvang het, maar geen verdonkering van liggaamsvloeistowwe plaasgevind het nie. Monsters 6 tot 8 is geneem gedurende tye dat die dosis Sinemet verlaag is. Monsters 9 tot 15 is geneem gedurende tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is en liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het.

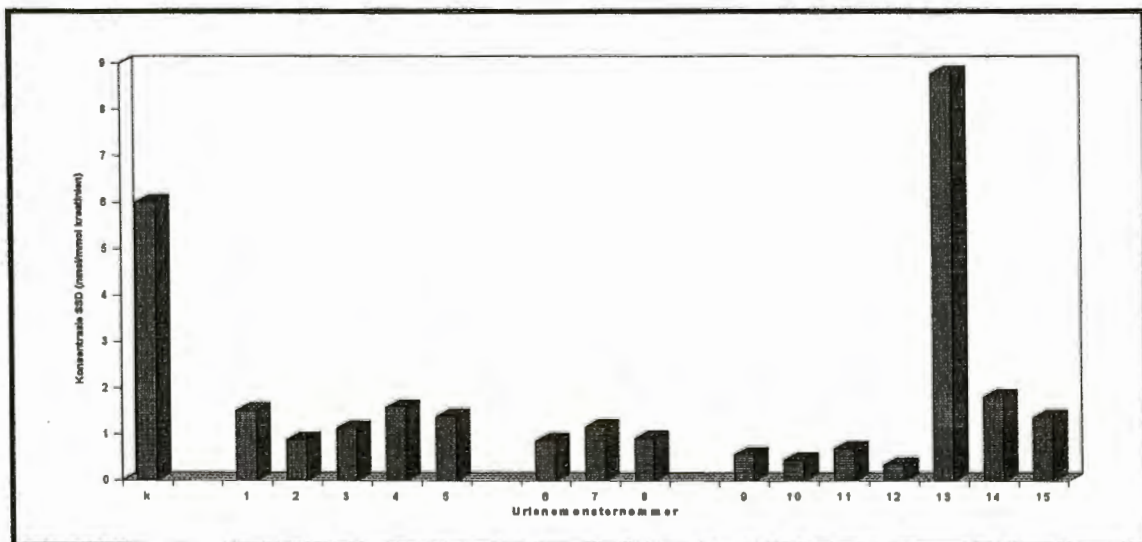


Figuur 6.35 (a) Die konsentrasie DA in die urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone.

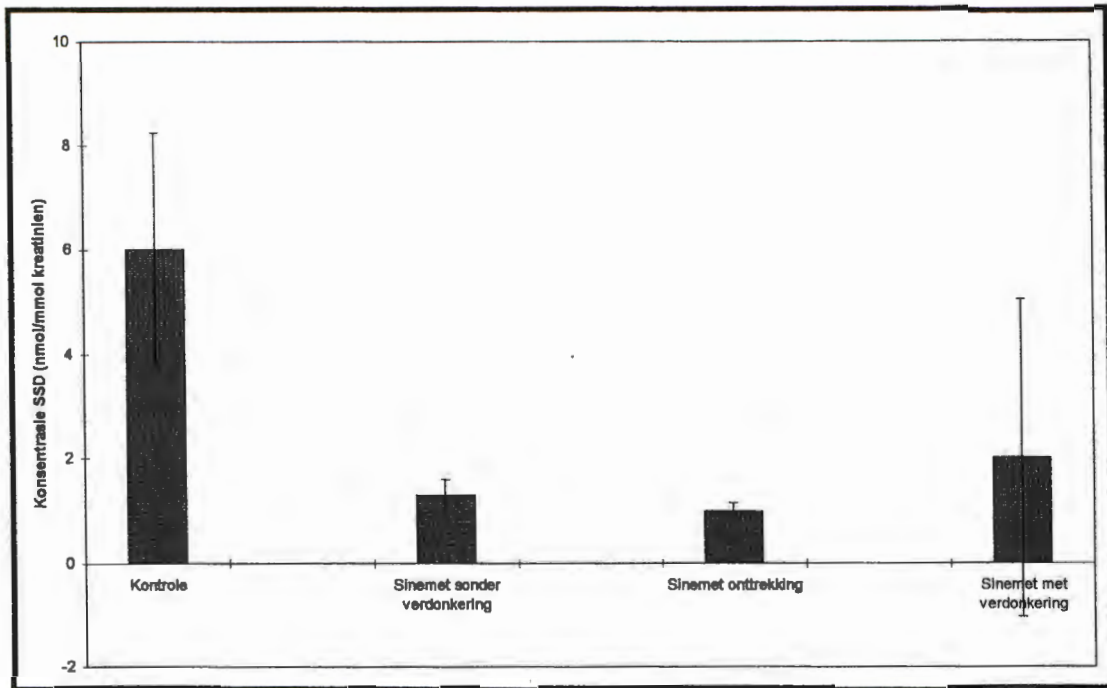


Figuur 6.35(b) Die gemiddelde konsentrasie DA in urienemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.

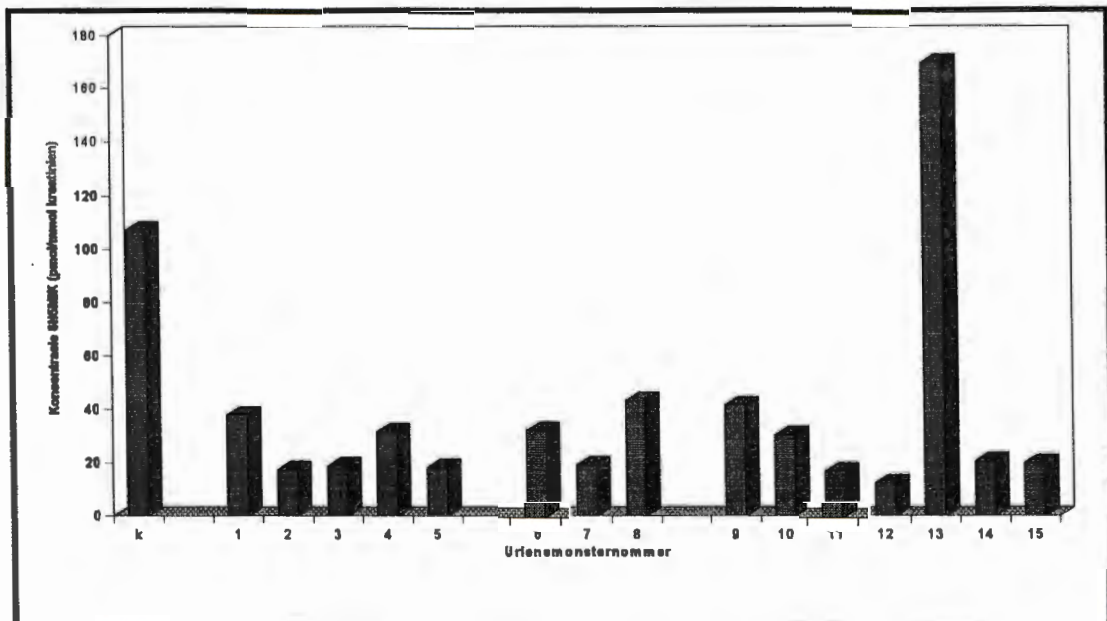
Figuur 6.35 (b) gee 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.35 (a).
 Figuur 6.36(b) bied 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.36(a).
 Figuur 6.37 (b) bied 'n opsomming van die data weergegee in figuur 6.37 (a).



Figuur 6.36(a) Die konsentrasie 5SSD in urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone.



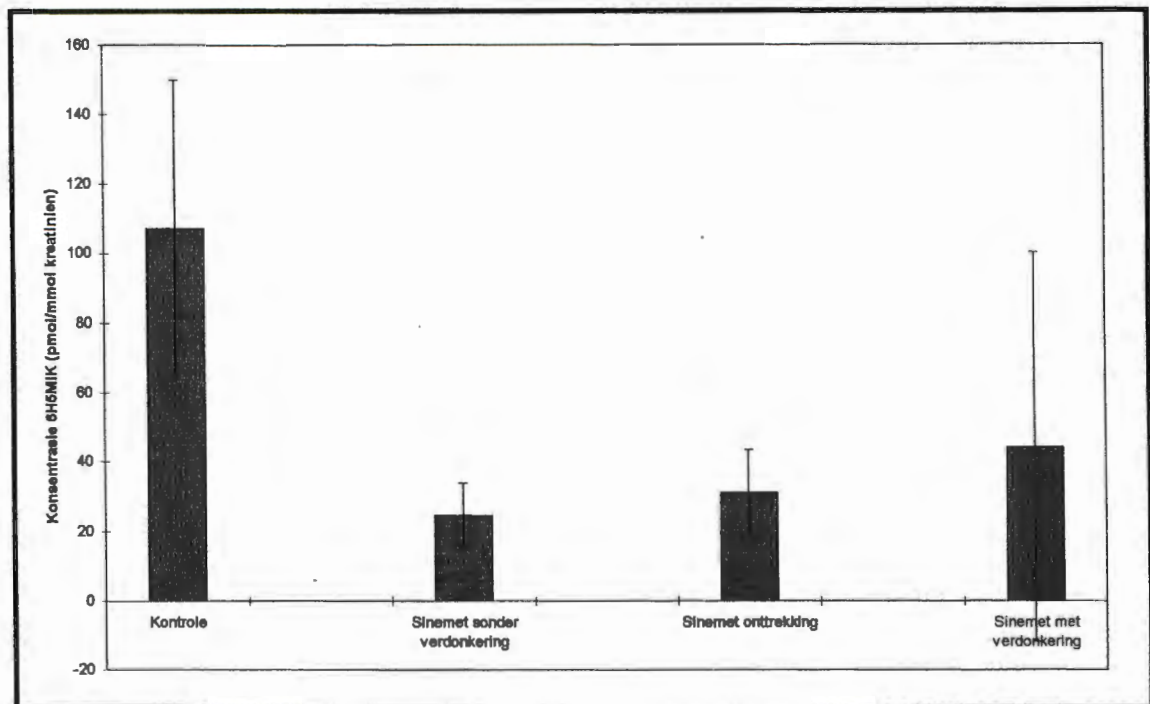
Figuur 6.36(b) : Die gemiddelde konsentrasie 5SSD in uriemonsters geneem gedurende spesifieke tydperke.



Figuur 6.37(a) : Die konsentrasie 6H5MIK in uriemonsters van die pasiënt en kontrolepersone

Vanuit figure 6.35 (a) en (b) is dit duidelik dat die konsentrasie DA in meeste van die uriemonsters van die pasiënt hoër is as die DA konsentrasie in kontrole uriemonsters. Die DA konsentrasie in die pasiënt se uriemonsters toon 'n mate van verlaging gedurende tydperke dat die

Sinemetdosis verlaag is. Die DA konsentrasie toon egter nie 'n dramatiese verlaging of verhoging gedurende tye dat die liggaamsvloeistowwe van die pasiënt verdonker het nie.



Figuur 6.37(b): Die gemiddelde konsentrasie 6H5MIK in urienemonsters van die pasiënt en kontrolepersone.

Vanuit figuur 6.36 en 6.37 is dit duidelik dat die 5SSD en 6H5MIK konsentrasies nie noemenswaardig verhoog is in die urienemonsters van die pasiënt geneem gedurende tye van verdonkering nie. Slegs in een van die urienemonsters (monster 13) geneem gedurende 'n periode van verdonkering was die 5SSD en 6H5MIK konsentrasies noemenswaardig verhoog. Ook 'n verlaging in die dosis Sinemet het nie die konsentrasie 5SSD of 6H5MIK in urienemonsters laat verlaag nie.

6.2.8 GC-MS en ES-MS analise van die verbindings in die vlekke op die pasiënt se klere

Daar is gepoog om die verbindings in die vlekke op die pasiënt se klere te laat oplos in 'n verskeidenheid oplosmiddels soos beskryf onder punt 4.2.10

(a) in hoofstuk 4. Die vlekke op die klere het nie ontkleur in enige organiese oplosmiddel nie. Slegs in 'n verdunde, waterige, alkaliese oplosmiddel, byvoorbeeld verdunde NaOH oplossing, het die vlekke ligter geword en die oplosmiddel verkleur wat 'n aanduiding was dat verbindings uit die vlekke in die oplosmiddel opgelos het. Vir alle verdere analyses van verbindings uit die vlekke is daar gebruik gemaak van verdunde NaOH oplossing om die verbindings uit die vlekke te laat oplos.

Die verbindings in die vlekke is geëkstraheer, gedroog en gederivatiseer vir GC-MS analise volgens die metode beskryf onder punt 4.2.10 (b). Die GC-MS totale ionchromatogramme verkry van organiese oplosmiddelekstrakte van verbindings uit die vlekke het heeltemal ooreengestem met ionchromatogramme van ongevlekte lap van die pasiënt se klere wat onderwerp is aan dieselfde organiese oplosmiddelekstraksie. Die GC-MS analise gedoen op organiese oplosmiddelekstrakte van klere wat sinteties gevlek is (Clark *et al.*, 1990) met L-DOPA en DA het dieselfde ionchromatogram gelewer.

Die verbindings in die vlekke is geëkstraheer, gederivatiseer en gedroog volgens die metode beskryf onder punt 4.2.10 (c). Die resultate van die ES-MS analise was dieselfde as dié verkry deur GC-MS analise. 'n Groot aantal verbindings was sigbaar in die ES-MS spektra, maar die spektra van die ekstrakte uit die gevlekte klere was ooreenstemmend aan die spektrum van die blanko (ekstrak uit ongevlekte lap van die pasiënt se klere) asook aan die spektra van ekstrakte uit klere wat sinteties gevlek is deur L-DOPA en DA oksidasie.

6.3 Samevatting

Geeneen van die siftingstoetse wat uitgevoer is op die pasiënt se uriene het 'n positiewe resultaat gelewer nie, met die uitsondering van een urienemonster wat positief getoets het met die ferrichloried toets. Sekere

metaboliete van L-DOPA en DA, naamlik DOPAC en VLA, kom in dramaties verlaagde vlakke in die uriene van die pasiënt voor gedurende tye dat die Sinemet dosis verlaag is. Hierdie metaboliete is egter nie dramaties verlaag of verhoog gedurende tye dat liggaamsvloeistofverdonkering plaasgevind het nie. Die konsentrasie van VMA in die urienemonsters was verhoog in sommige urienemonsters afkomstig van tye van verdonkering van liggaamsvloeistowwe sowel as in urienemonsters afkomstig van tye sonder liggaamsvloeistofverdonkering. Die urinêre konsentrasie van twee van die metaboliete van tirosien katabolisme, naamlik 4-HFA en 4-HFL, was nie noemenswaardig verlaag of verhoog gedurende tye van Sinemet onttrekking of liggaamsvloeistofverdonkering nie. Die urinêre konsentrasies van tirosien, fenielalanien en triptofaan het ook geen dramatiese verhoging of verlaging getoon gedurende periodes van Sinemet onttrekking of liggaamsvloeistofverdonkering nie. Vanuit die resultate was dit dus duidelik dat die vlakke van tirosien, 4-HFA en 4-HFL nie verband hou met liggaamsvloeistofverdonkering of die dosis medikasie wat deur die pasiënt geneem is nie. Dit is egter belangrik om op te let dat die vlakke van tirosien, 4-HFA en 4-HFL verhoog was bo die normale maksimum konsentrasie. Hierdie verhoogde vlakke mag dui op 'n defek in tirosien metabolisme in die pasiënt. Die vlakke van tirosien in die plasma van die pasiënt is nie gemonitor in hierdie ondersoek nie. Dit sou raadsaam wees om die vlakke van tirosien in die plasma van die pasiënt te monitor om moontlike abnormaliteite in tirosien metabolisme te ondersoek.

Die hoof urinêre metaboliet van die feomelanien metabolisme weg, 5SSD, is suksesvol gesintetiseer deur middel van 'n ensiematiese metode. Hierdie metaboliet was nie noemenswaardig verhoog in urienemonsters geneem gedurende tye van verdonkering nie met die uitsondering van een monster. Die konsentrasie 5SSD in die meeste van die urienemonsters van die pasiënt is duidelik laer as die 5SSD konsentrasie in die urienemonsters van kontrolepersone.

'n Belangrike metaboliet van die eumelanien metaboliese weg, 6H5MI2K, is suksesvol gesintetiseer deur middel van 'n chemiese metode. Hierdie metaboliet was ook nie noemenswaardig verhoog in urienemonsters geneem gedurende tye van verdonkering nie met die uitsondering van een monster. Die konsentrasie 6H5MIK in die meeste urienemonsters van die pasiënt was laer as die konsentrasie van hierdie verbinding in kontrole urienemonsters.

Verskeie tegnieke is aangewend in 'n poging om 5SSD, L-DOPA, DA en OMD in uriene te kwantifiseer. Veral elektrospoei-massaspektrometrie blyk effektief te wees in die deteksie van L-DOPA, DA en OMD. Deur middel van hierdie tegniek kon L-DOPA en OMD in die uriene van die pasiënt gekwantifiseer word, nadat die verbindings gederivatiseer is deur middel van butanoliese HCl. Deur fyn wysiginge aan te bring in die derivatiseringskondisies was dit ook moontlik om DA te kwantifiseer in die urienemonsters van die pasiënt. Die effektiwiteit van die alumina ekstraksiemetode is ook getoets, maar hierdie metode het nie herhaalbare resultate gegee vir die ekstraksie van L-DOPA, DA of OMD nie.

Die OMD konsentrasies in die urienemonsters geneem gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering is duidelik verhoog in vergelyking met die urinêre vlakke van hierdie metaboliet gedurende tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Die L-DOPA konsentrasie in die meeste urienemonsters geneem gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering was verhoog in vergelyking met die L-DOPA konsentrasies in urienemonsters afkomstig van tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Slegs by twee urienemonsters, geneem gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering, was die L-DOPA konsentrasie soortgelyk aan dié in monsters van tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie.

Daar is geslaag daarin om die verbindings in die vlekke op die klere te laat oplos in waterige, alkaliese medium. Geen verbindings wat die oorsaak kan wees van die vlekke kon egter deur middel van GC-MS of ES-MS analise geïdentifiseer word nie.

HOOFSTUK 7

BESPREKING

7.1 Bespreking van die ultrastrukturele ondersoek

Die resultate verkry deur middel van 'n ultrastrukturele ondersoek van die haarwortel melanosiete en keratinosiete van die pasiënt het aangetoon dat hierdie selle nie die reuse melanosome, kenmerkend van Chediak-Higashi sindroom, bevat nie. Hieruit kan afgelei word dat hierdie pasiënt beslis nie 'n tipiese vorm van Chediak-Higashi sindroom het nie. Dit is dus moontlik nie van onmiddellike dat die pasiënt spesifiek behandel moet word teen die ontwikkeling van die simptome van hierdie sindroom nie. Die moontlikheid bestaan egter dat daar wel 'n mutasie, wat nog nie voorheen beskryf is nie, voorkom in die Lyst geen in die pasiënt. Hierdie moontlikheid kan slegs ondersoek word deur mutasie analise uit te voer van die Lyst geen in die pasiënt.

Daar is opgemerk dat geen volledig ontwikkelde fase 4 melanosome waargeneem kon word in die selle van die haarwortels voor L-DOPA inkubasie nie. Slegs fase 2 en 3 premelanosome is opgemerk in haarwortel medulla en korteksselle voor L-DOPA inkubasie. Dit is moontlik die rede waarom hierdie pasiënt hipopigmentering vertoon. Vanuit die kliniese beeld, veral die okulére pigmentasie, van die pasiënt is dit duidelik dat die pasiënt nie tirosinase negatiewe albinisme het nie. Daar kom duidelik tirosinase aktiwiteit voor in die pigmentselle van die pasiënt, aangesien haar oë bykans normale pigmentasie vertoon, daar gepigmenteerde vlekke op haar vel voorkom en die melanosome in die haarwortelselle verhoogde pigmentasie vertoon na inkubasie in L-DOPA. Die vesikelbevattende organel wat opgemerk is in 'n haarwortelmelanosiet na L-DOPA inkubasie is 'n vesikuloglobulêre liggaampie, 'n baie vroeë fase van melanosoomontwikkeling. Die haarwortel melanosiete, melanosome en korteks en medullaselle het geen ooglopende abnormaliteite in hul struktuur

vertoon nie, en die oorsaak van hipopigmentering by hierdie pasiënt lê dus moontlik nie op hierdie vlak nie.

7.2 Bespreking van die ondersoek na die oorsprong van liggaamsvloeistofverdonkerig by die pasiënt

Deur die uitvoer van die algemene siftingstoetse is vasgestel dat die verdonkering van die pasiënt se liggaamsvloeistowwe nie verband hou met bloed, hemoglobien, verhoogde vlakke van ketone of sulfiete, of verhoogde vlakke van glukose en reduserende suikers in die liggaamsvloeistowwe nie. Siftingstoetse het wel aangetoon dat sommige urienemonsters spoorhoeveelhede proteïene bevat het. Die spoorhoeveelhede proteïene is egter opgemerk in beide urienemonsters afkomstig van tye van verdonkering en urienemonsters afkomstig van tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie, en hou dus nie noodwendig verband met die verdonkering nie.

Die normale urienêre pH by die mens wissel van ongeveer 4.8 tot 7.8. Sommige urienemonsters van die pasiënt, beide afkomstig van tye van verdonkering en tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie, het pH waardes bokant hierdie waarde gehad, moontlik as gevolg van die natriumbikarbonaatbehandeling wat die pasiënt ontvang. Hierdie behandeling kan lei tot 'n algemene verhoging in die pH van liggaamsvloeistowwe wat die polimerisering van melanogene na melanië kan versnel. Volgens Altmann (1980) vind die spontane vorming van melanië vanaf melanogene in uriene slegs plaas by urinêre pH van 7 of meer. Die urienemonsters afkomstig ten tye van verdonkering het pH waardes gehad wat ooreengestem het met die pH waardes afkomstig ten tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Die verdonkering van die liggaamsvloeistowwe hou dus nie direk verband met die pH van die liggaamsvloeistowwe nie, maar indien melanogene voorgekom het in urienemonsters sou die hoë urinêre pH polimerisering na melanië bevorder het.

Vanuit die resultate van meer spesifieke siftingstoetse wat uitgevoer is op die urienemonsters van die pasiënt kon afgelei word dat die liggaamsvloeistofverdonkering nie die gevolg is van verhoogde vlakke hemoglobien of mioglobien, urobilien, urobilinogeen, porfobilinogeen, vrye porfiriene, indoksielsulfaat of homogentisiensuur wat in die liggaamsvloeistowwe voorkom nie. Die Thormählen toets is 'n spesifieke toets wat verhoogde vlakke van sekere melanogene, naamlik indole wat ongesubstitueer is in posisie twee van die indoliese ring, in uriene aantoon (Scott *et al.*, 1988). Aangesien hierdie siftingstoets 'n negatiewe resultaat gelewer het vir die uriene van die pasiënt kan aanvaar word dat ongesubstitueerde indoliese melanogene, byvoorbeeld DHI nie in verhoogde vlakke in die uriene voorgekom het nie. Een urienemonster afkomstig van 'n tyd dat verdonkering van liggaamsvloeistowwe nie plaasgevind het nie, het 'n positiewe resultaat gelewer met die ysterchloriedtoets. Hierdie monster is egter geneem gedurende 'n tydperk dat die pasiënt 'n infeksie gehad het en met verskeie medikamente behandel is. Hierdie medikamente is moontlik verantwoordelik vir die positiewe resultaat.

Vanuit die resultate van die kwantifisering van melaniën verwante organiese sure in die urienemonsters van die pasiënt kan afgelei word dat die urinêre konsentrasie van HVA, DOPAC en VLA nie 'n direkte verband vertoon met die verdonkering van liggaamsvloeistowwe nie, aangesien hierdie metaboliete nie noemenswaardige wysiging in urinêre konsentrasie vertoon gedurende tye van liggaamsvloeistofverdonkering in vergelyking met die urinêre vlakke van hierdie metaboliete gedurende tye dat liggaamsvloeistofverdonkering nie plaasgevind het nie. Die invloed van Sinemet medikasie is duidelik waarneembaar in die verhoogde urinêre ekskresie van DOPAC en VLA gedurende tye van Sinemet behandeling. Die konsentrasie HVA in urienemonsters afkomstig van tye dat die pasiënt met Sinemet behandel is val binne die normaalgrense vir hierdie metaboliet en die konsentrasie HVA in urienemonsters afkomstig van tye dat die Sinemet dosis verlaag is, is ook abnormaal laag. Hierdie lae konsentrasies HVA in die

urine van die pasiënt dui moontlik op 'n defek in die metabolisme van DA in die liggaam van die pasiënt (Davis *et al.*, 1981). Die konsentrasie DOPAC en VLA in urienemonsters gedurende tye dat die pasiënt nie met Sinemet behandel is nie het egter binne die normale konsentrasiegebied geval. Die urinêre VMA konsentrasie toon 'n verhoging in sommige van die urienemonsters afkomstig van tye van verdonkering in vergelyking met die VMA vlakke gedurende tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Urienemonsters afkomstig van tye van 'n verlaging in die dosis Sinemet sonder liggaamsvloeistofverdonkering het egter ook verhoogde urinêre konsentrasies VMA getoon. Verhoogde urinêre vlakke van VMA kan dus nie direk gekoppel word met liggaamsvloeistofverdonkering nie. Vanuit die kwantitatiewe organiese suuranalises was dit ook duidelik dat alternatiewe metaboliete van fenielalanien, byvoorbeeld fenielpiruvaat, fenielasetaat en fenielaktaat, wat gewoonlik in verhoogde vlakke uitgeskei word in urine by persone met fenielketonurie (Mathews & van Holde, 1990) nie verhoog was in enige van die urienemonsters van die pasiënt nie. Die rede waarom Lofenalac melk so voordelig was vir die pasiënt as baba kan nie verklaar word uit die resultate wat verkry is nie.

Die resultate uiteengesit onder punt 6.2.2 dui daarop dat die konsentrasie 4-HFA en 4-HFL in urienemonsters nie beïnvloed is deur Sinemet medikasie of verband hou met die verdonkering van liggaamsvloeistowwe nie. Dit is egter opvallend dat die konsentrasie van hierdie metaboliete verhoog is bo die urinêre normaalwaardes in meeste van die urienemonsters van die pasiënt. 'n Verhoging in die vlak van hierdie metaboliete dui op 'n moontlike afwyking in die metabolisme van tirosien (Bremer *et al.*, 1981).

Volgens 'n geneesheer van die pasiënt kan verdonkering van liggaamsvloeistowwe by die pasiënt gewoonlik geassosieer word met verhoogde proteïeninnname. Volgens Daniel *et al.* (1976) inhibeer verhoogde vlakke van aminosure in die sirkulasie die vervoer van L-DOPA tot in die breinweefsel. Verhoogde vlakke aminosure in sirkulasie kan dus meebring dat toegediende L-DOPA tot 'n mindere mate in breinsirkulasie opgeneem

word en tot hoër mate perifereer gemetaboliseer sou word. Aangesien 'n perifere dekarboksilase inhibeerder, karbidopa, saam met L-DOPA toegedien word, sal L-DOPA dus tot mindere mate perifereer gedekarboksileer word na DA en eerder dus gemetaboliseer word na OMD of geoksideer word na melanien voorgangers en melanien. Sodoende is dit moontlik dat verhoogde aminosuurlakke in die bloed kan lei tot verdonkering van liggaamsvloeistowwe by 'n persoon wat met L-DOPA en karbidopa behandel word. Vanuit die kwantitatiewe aminosuuranalises op die uriene van die pasiënt kan egter afgelei word dat die verdonkering van die liggaamsvloeistowwe nie verband hou met 'n verhoogde vlak van aminosure in die sirkulasie nie. In geen van die urienemonsters van die pasiënt het abnormaal verhoogde konsentrasies fenielalanien voorgekom nie, wat weereens die bevindinge van vorige navorsers bevestig dat die pasiënt nie fenielketonurie het nie, alhoewel Lofenalac melk so voordelig was vir haar as baba. Dit is egter van belang dat die urinêre vlakke van tirosien, en die alternatiewe metaboliëte daarvan, verhoog is bo normale vlakke in meeste van die urienemonsters van die pasiënt. Dit sou raadsaam wees om die moontlikheid van abnormaliteite in tirosien metabolisme te ondersoek deur ook die tirosienvlakke in die plasma van die pasiënt te monitor.

Die vlakke van die urinêre metaboliëte afkomstig van die metabolisme van karbidopa, soos gemeld onder punt 3.2.3, is nie gemonitor in hierdie studie nie. Die urinêre metaboliëte afkomstig van karbidopa besit nie meer die chemiese struktuur wat nodig is vir die spontane polimerisering na die swart polimeer melanien, soos getoon in figuur 2.4, nie. Dit is dus onwaarskynlik dat hierdie metaboliëte kon bydra tot die verdonkering van liggaamsvloeistowwe deur te polimeriseer na melanien. Geen bron wat nagegaan is in verband met die nuwe-effekte van karbidopa toediening toon enige assosiasie tussen karbidopa toediening en die verdonkering van liggaamsvloeistowwe nie (Budavari, 1989; Reynolds, 1993). Volgens Goodman Gilman *et al.* (1985) toon karbidopa geen farmakologiese aktiwiteit wanneer dit alleen toegedien word nie, en die nuwe-effekte van karbidopa wanneer dit toegedien word in kombinasie met L-DOPA is die gevolg van die

bevordering van die effekte van L-DOPA. Karbidopa en die metaboliete daarvan speel dus waarskynlik nie 'n direkte rol in die verdonkering van liggaamsvloei-stowwe by die pasiënt nie.

Die konsentrasie van OMD, die hoof metaboliet van Sinemet medikasie (Titus *et al.*, 1990) afkomstig van L-DOPA metabolisme, is egter duidelik verhoog in al die urienemonsters van die pasiënt afkomstig van tye dat die liggaamsvloei-stowwe van die pasiënt verdonker het in vergelyking met die OMD konsentrasie in urienemonsters afkomstig van tye dat liggaamsvloei-stofverdonkering nie plaasgevind het nie. Die konsentrasie L-DOPA is verhoog in sommige van die urienemonsters afkomstig van tye dat die liggaamsvloei-stowwe van die pasiënt verdonker het in vergelyking met die L-DOPA konsentrasie in urienemonsters afkomstig van tye dat verdonkering nie plaasgevind het nie. Hieruit kan afgelei word dat die verdonkering van liggaamsvloei-stowwe by die pasiënt verband hou met die metabolisme van Sinemet medikasie in haar liggaam. OMD self polimeriseer nie na melanien nie, maar hierdie verbinding is direk afkomstig van die metabolisme van L-DOPA (Jouve *et al.*, 1992; Hyland *et al.*, 1996). Die vlakke van OMD in die uriene van die pasiënt gee dus 'n aanduiding van die vlakke van L-DOPA wat in die liggaamsvloei-stowwe teenwoordig was gedurende tye van verdonkering. OMD het 'n langer plasma halfleeftyd as L-DOPA. Die plasma halfleeftyd van OMD is 15 uur en dié van L-DOPA is 2 uur (Titus *et al.*, 1990). OMD vlakke in die pasiënt se uriene gee dus 'n weergawe van die vlakke van L-DOPA in die liggaamsvloei-stowwe van tot 15 ure voor monsterneming. Urienemonsters ten tye van verdonkering is gewoonlik geneem binne 'n dag nadat verdonkering waargeneem is, maar gewoonlik nie onmiddelik nadat verdonkering waargeneem is nie. Dit is dus moontlik dat 'n groot fraksie van die L-DOPA wat in die liggaamsvloei-stowwe teenwoordig was ten tye van verdonkering reeds verval het, onder andere deur outo-oksidering na melanien en omskakeling na OMD, teen die tyd dat die urienemonsters geneem is.

7.3 Samevatting

Vanuit hierdie ondersoek is vasgestel dat die pasiënt nie 'n bekende, tipiese vorm van Chediak-Higashi sindroom, gekenmerk deur die voorkoms van reuse melanosome in melanosiete, het nie.

Daar is ook vasgestel dat die sporadiese verdonkering van liggaamsvloei-stowwe verband hou met die urinêre vlakke van die melanogene L-DOPA en OMD maar nie van hul kataboliese produkte nie. Die ondersoek dui ook aan dat die verdonkering nie verband hou met die urinêre vlakke van die melanosietspesifieke metaboliëte, 6H5MIK of 5SSD, nie.

Die twee hoof doelwitte van hierdie ondersoek, soos gestel onder punt 3.4 in hoofstuk 3, is dus bereik.

Soos bespreek in hoofstuk 3 is vermoed dat die verdonkering van liggaamsvloei-stowwe by die pasiënt moontlik verband hou met 'n defek in melaniënbiosintese by die pasiënt. Vanuit die resultate is dit duidelik dat die melanosietspesifieke metaboliëte, 6H5MIK, nie verband hou met liggaamsvloei-stofverdonkering nie. Die hoof urinêre metaboliëte van Sinemet medikasie, OMD, het egter 'n duidelike verband getoon met die verdonkering van liggaamsvloei-stowwe. Die sporadiese verdonkering van liggaamsvloei-stowwe hou dus eerder verband met die medikasie van die pasiënt as met 'n defek in melaniënbiosintese. Verdonkering vind sporadies plaas alhoewel die pasiënt daagliks met dieselfde dosis Sinemet behandel word. Verhoogde proteïëninname beïnvloed die metabolisme van Sinemet in die liggaam. Geen verband kon egter gevind word tussen urinêre aminosuurvlakke en die verdonkering van liggaamsvloei-stowwe nie.

BIBLIOGRAFIE

Agrup, G., Bengtsson, M., Falck, B., Persson, K., Rorsman, H., Rosengren, A.M. & Rosengren, E. (1976). Demonstration of 3-methoxytyrosine in the urine of melanoma patients. **Acta Dermatovenereologica (Stockholm) 56**, 27-31.

Agrup, G., Edholm, L.E., Rorsman, H. & Rosengren, E. (1983). Diastereomers of 5-S-cysteinyldopa. **Acta Dermatovenereologica (Stockholm) 63**, 59-91.

Agrup, G., Falck, B., Hansson, C., Rorsman, H., Rosengren, A.M. & Rosengren, E. (1977). Metabolism of 5-S-cysteinyldopa by O-methylation. **Acta Dermatovenereologica 57**, 309-312.

Aime, S., Fasano, M. & Groombridge, C.J. (1991). NMR studies of melanins: characterization of a soluble melanin free acid from sepia ink. **Pigment Cell Research 4**, 216-221.

Altmann, P. (1980). Black urine. **Postgraduate Medical Journal 56**, 877-878.

Anderson, G.M. (1988). Liquid chromatographic determination of urinary catecholamines after one-step alumina extraction. **Journal of Chromatography 424**, 373-377.

Angelman, H. (1965). "Puppet" children. **Developmental Medicine and Child Neurology 7**, 681-688.

Aroca, P., Solano, F., Salinas, J.C., Garcia-Borron & Lozano, J.A. (1992). Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. **European Journal of Biochemistry 208**, 155-163.

Banda, P.W., Sherry, A.E. & Blois, M.S. (1977). Column cation-exchange separation of melanin-related metabolites in urine from cases of melanoma. **Clinical Chemistry** **23**, 1397-1401.

Bartholini, G., Kuruma, I. & Pletscher, A. (1972). The metabolic pathways of L-3-O-methyldopa. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **183(1)**, 65-72.

Beaudet, A.L., Scriver, C.R., Sly, W.S., Valle, D., Cooper, D.N., McKusick, V.A. & Schmidke, J. (1989). Genetics and biochemistry of variant human phenotypes. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (eds.) *The metabolic basis of inherited disease*. Sixth edition. New York: Mc Graw-Hill, p. 3-53.)

Ben Ezra, D., Mengitsu, F., Cividalli, G., Weizman, Z., Merin, S. & Auerbach, E. (1980). Chédiak-Higashi syndrome: Ocular findings. **Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus** **17**, 68-74.

Benson, P.F. & Fensom, A.H. (1985). *Genetic biochemical disorders*. Oxford: Oxford University Press, p. 149-272.

Bishop, M.L., Duben-Von Laufen, J.L. & Fody, E.P. (1985). *Clinical chemistry: Principles, procedures, correlations*. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 604 p.

Blume, R.S. & Wolff, S.M. (1972). The Chediak-Higashi syndrome: Studies in four patients and a review of the literature. **Medicine** **51**, 247-280.

Boissy, R.E. (1988). The melanocyte: Its structure, function and subpopulations in skin, eyes and hair. **Dermatologic Clinics** **6**, 161-173.

Boissy, R.E., Zhao, H., Abdel-Malek, Z., Kumar, M.K. & Nordlund, J.J. (1992). Melanocytes cultured from Chediak-Higashi syndrome express cellular defects. **Clinical Research** **40** (2), A526.

Boivin, G.P., Bradfield, J.F. & Swinfard, R. (1993). Diagnostic exercise: Brown urine in a Sinclair miniature pig. **Laboratory Animal Science** **43**, 102-104.

Bondy, P.K. & Rosenberg, L.E. (1969). Diseases of metabolism: Genetics and metabolism. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 710p.

Bray, G.A., Dahms, W.T., Swerdloff, R.S., Fiser, R.H., Atkinson, R.L. & Carnel, R.E. (1983). The Prader-Willi syndrome: A study of 40 patients and a review of the literature. **Medicine** **62**, 59-80.

Breatnach, A.S. (1975). Aspects of epidermal ultrastructure. **Journal of Investigative Dermatology** **65**, 2-15.

Bremer, H.J., Duran, M. & Kamerling, J.P. (1981). Disturbances of amino acid metabolism: Clinical chemistry and diagnosis. Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 525p.

Budavari, S. (1989). The Merck index. 11th edition. Rahway: Merck & Co., Inc., 10100p.

Butler, M.G., Meaney, F.J., Palmer, C.G. (1986). Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Palmer-Labhart-Willi syndrome. **American Journal of Human Genetics** **23**, 793-809.

Carrillo-Farga, J., Gutierrez-Palomera, G., Ruiz-Maldonado, R., Rondan, A. & Antuna, S. (1990). Giant cytoplasmic granules in Langerhans cells of

Chediak-Higashi syndrome. **American Journal of Dermatopathology** **12**(1), 81-87.

Carstam, R., Edner, C., Hansson, C., Lindbladh, C., Rorsman, H. & Rosengren, E. (1986). Metabolism of 5-S-glutathionyl-dopa. **Acta Dermato Venereologica** **66** (supplement 126), 1-12.

Cassidy, S.B. (1984). Prader-Willi syndrome. **Current Problems in Pediatrics** **14**, 5-55.

Chalmers, R.A. & Lawson, A.M. (1982). Organic acids in man: Analytical chemistry, biochemistry and diagnosis of the organic acidurias. London: Chapman & Hall, 240 p.

Clark Jr., M.B., Gardella Jr., J.A., Schultz, T.M., Patil, D.G. & Salvati Jr., L. (1990). Solid-state analysis of eumelanin biopolymers by electron spectroscopy for chemical analysis. **Analytical Chemistry** **62**, 949-956.

Creel, D.J., Bendel, C.M., Weisner, G.L., Wirtschafter, J.D., Arthur, D.C. & King, R.A. (1986). Abnormalities of the central visual pathways in Prader-Willi syndrome associated with hypopigmentation. **New England Journal of Medicine** **314**, 1606-1609.

Creel, D.J., Boxer, L.A. & Fauci, A.S. (1983). Visual and auditory anomalies in Chédiak-Higashi syndrome. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology** **55**, 252-257.

Constantini, C., Crescenzi, O. & Prota, G. (1990). New intermediates of phaeomelanogenesis in vitro beyond the 1,4-benzothiazine stage. **Tetrahedron** **46**, 6831-6838.

Daniel, P.M., Moorhouse, S.R. & Pratt, O.E. (1976). Do changes in blood levels of other aromatic aminoacids influence levodopa therapy?. **The Lancet**, 95.

Davis, G.C., Koch, D.D. & Kissinger, P.T. (1981). Determination of tyrosine and tryptophan metabolites in body fluids using electrochemical detection. (In: Kabra, P.M. & Marton, L.J. (eds.) *Liquid chromatography in clinical analysis*. New Jersey: Humana Press, p.253-305).

Duchon, J. & Matous, B. (1973). Dopa and its metabolites in melanoma urine. **Pigment Cell** 1, 317-322.

Duchon, J., Matous, B. & Pavel, S. (1977). Melanogenuria as consequence of elevated tyrosinase activity in melanoma. **Acta Universitatis Carolinae Medica Monographia** 78, 139-144.

Durandy, A., Breton-Gorius, J., Guy-Grand, D., Dumez, C. & Griscelli, C. (1993). Prenatal diagnosis of syndromes associating albinism and immune deficiencies (Chediak-Higashi syndrome and variant). **Prenatal Diagnosis** 13 (1), 13-20.

Durham-Pierre, D., Gardner, J.M., Nakatsu, Y., King, R.A., Francke, U., Ching, A., Aquaron, R., del Marmol, V. & Brilliant, M.H. (1994). African origin of an intragenic deletion of the human P gene in tyrosinase positive oculocutaneous albinism. **Nature Genetics** 6, 176-179.

Duthel, J.M. & Vallon, J.J. (1991). Indolic urinary melanogens: Separation and identification by gas chromatography with selected-ion monitoring mass spectrometry of 5-hydroxy-6-methoxyindole-2-carboxylic and 5-methoxy-6-hydroxyindole-2-carboxylic acids. **Journal of Chromatography** 570, 166-172.

Ekelund, M.C., Carstam, R., Hansson, C., Rorsman, H. & Rosengren, E. (1985). Urinary excretion of 5-S-cysteinyl-dopa and 6-hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid: Differences between pigmented and albino mice. **Acta Dermato-Venereologica** **65**, 437-439.

Faigle, W., Raposo, G., Tenza, D., Pinet, V., Vogt, A.B., Kropshofer, H., Fischer, A., de Saint-Basile, G. & Amigorena, S. (1998). Deficient peptide loading and MHC class 2 endosomal sorting in a human genetic immunodeficiency disease: the Chediak-Higashi syndrome. **Journal of Cell Biology** **141**, 1121-1134.

Fawcett, D.W., Bloom, W. & Raviola, E. (1994). A textbook of histology. Twelfth edition. New York: Chapman & Hall, 964 p.

Frenk, E. (1979). Pigment cell biology and its relation to disorders of melanin pigmentation. **Dermatologica** **159**, 185-194.

Giebel, L.B., Tripathi, R.K., Strunk, K.M., Hanifan, J.M., Jackson, C.E., King, R.A. & Spritz, R.A. (1991). Tyrosinase gene mutations associated with type 1B ("yellow") oculocutaneous albinism. **American Journal of Human Genetics** **48**, 1159-1167.

Gillen, L.F. (1985). Hemoglobins, myoglobin and porphyrins. (In: Bishop, M.L., Duben-Von Laufen, J.L. & Fody, E.P. (eds.) *Clinical Chemistry: principles, procedures and correlations*. Philadelphia: J.B. Lippincott. p.399.)

Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Rall, T.W. & Murad, F. (1985). The pharmacological basis of therapeutics. 7th edition. New York: Macmillan, 1839p.

Grainger, K.M. (1973). Pigmentation in Parkinson's disease treated with levodopa. **The Lancet** **13**, 97-98.

Granner, D.K. (1985). Hormones and the adrenal gland. (In: Martin Jr., D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. & Granner, D.K., (eds.) Harper's Review of Biochemistry. 20th ed. California: Lange Medical Publications p.548-569.)

Gray, C.H. (1974). Clinical Chemical Pathology. Seventh edition. London: Edward Arnold. p. 216-217.

Greep, R.O. (1996). Histology. Second edition. New York: McGraw-Hill, 914p.

Grossi, C.E., Crist, W.M., Abo, T., Velardi, A. & Cooper, M.D. (1985). Expression of the Chediak-Higashi lysosomal abnormality in human peripheral blood lymphocyte subpopulations. **Blood** **65**, 837: 844.

Guyton, A.C. (1991). Textbook of medical physiology. Eighth edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1014p.

Ham, A.W. & Cormack, D.W. (1979). Histology. Eighth edition. Philadelphia: J.B.Lippincott Company, 966p.

Hansson, C. (1984). 6-Hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid in normal human urine. **Acta Dermato-Venereologica** **64**, 185-190.

Hansson, C. (1988). Some indolic compounds as markers of the melanocyte activity. **Acta Dermato-Venereologica Supplement** **138**, 1-60.

Hara, H., Walsh, N., Yamada, K. & Jimbow, K. (1994). High plasma level of an eumelanin precursor, 6-hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid, as a prognostic marker for malignant melanoma. **Journal of Investigative Dermatology** **102**, 501-505.

Harmon, K.R., Witkop, C.J., White, J.G., King, R.A., Peterson, M., Moore, D., Tasjian, J., Marinelli, W.A. & Bitterman, P.B. (1994). Pathogenesis of pulmonary fibrosis: Platelet-derived growth factor precedes structural alterations in the Hermansky-Pudlak syndrome. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** **123(4)**, 617-627.

Harville, T.O., Williams, L.W., Graham, M.L. & Durham, N.C. (1994). Successful treatment of Chediak-Higashi syndrome with bone marrow transplantation. **Journal of allergy and clinical immunology** **93(1)**, 276.

Hearing, V.J. (1993). Invited editorial: Unraveling the melanocyte. **American Journal of Human Genetics** **52**, 1-7.

Hearing, V.J. & Tsukamoto, K. (1991). Enzymatic control of pigmentation in mammals. **FASEB Journal** **5**, 2902-2909.

Hittner, H.M., King, R.A., Riccardi, V.M., Ledbetter, D.H., Borda, R.P., Ferrell, R.E. & Kretzer, F.L. (1982). Oculocutaneous albinoidism as a manifestation of reduced neural crest derivatives in the Prader-Willi syndrome. **American Journal of Ophthalmology** **94**, 328-337.

Horikoshi, T., Ito, S., Wakamatsu, K., Onodera, H. & Eguchi, H. (1994). Evaluation of melanin-related metabolites as markers of melanoma progression. **Cancer** **73**, 629-636.

Hornabrook, R.W., McDonald, W.I. & Carroll, R.L. (1980). Congenital nystagmus among the Red-skins of the highlands of Papua New Guinea. **British Journal of Ophthalmology** **64**, 375-380.

Hu, F., Hanifan, J.M., Prescott, G.H. & Tongue, H.C. (1980). Yellow mutant albinism: Cytochemical, ultrastructural and genetic characterization

suggesting multiple allelism. **American Journal of Human Genetics** **32**, 387-395.

Hudon, J. (1994). Biotechnological applications of research on animal pigmentation. **Biotech. Adv.** **12**, 49-69.

Hyland, K., Biaggioni, I., Elpeleg, O.N., Nygaard, T.G. & Gibson, K.M. (1996). Disorders of neurotransmitter metabolism. (In: Blau, N., Duran, M. & Blaskovics, E. (eds). *Physicians guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. London: Chapman & Hall Medical. p. 79-97.).

Hyland, K., Surtees, R.A.H., Rodeck, C., Clayton, P.T. (1992). Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: Clinical features, diagnosis and treatment of a new inborn error of neurotransmitter amine synthesis. **Neurology** **42**, 1980-1988.

Imai, K., Arizuma, N., Wang, M., Yoshiue, S. & Tamura, Z. (1972). Gaschromatographic determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) in urine. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** **20**, 2436-2439.

Inazu, M. & Mishima, Y. (1993). Detection of eumelanogenic and pheomelanogenic melanosomes in the same normal human melanocyte. **Journal of Investigative Dermatology** **100**, S172-S175.

Ito, S. (1993). High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of eu- and pheomelanin in melanogenesis control. **Journal of Investigative Dermatology** **100**, S166-S171.

Ito, S., Kato, T., Maruta, K. & Fujita, K. (1984). Determination of DOPA, dopamine and 5-S-cysteinyl-dopa in plasma, urine and tissue samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography** **311**, 154-159.

Ito, S. & Kato, T., Maruta, K., Jimbow, K. & Fujita, K. (1985). "Total" acidic metabolites of catecholamines in urine as determined by hydrolysis with hydriodic acid and liquid chromatography: Application to patients with neuroblastoma and melanoma. **Clinical Chemistry** **31(7)**, 1185-1188.

Ito, S. & Prota, G. (1977). A facile one-step synthesis of cysteinyl dopas using mushroom tyrosinase. **Experientia** **33**, 1118-1119.

Ito, S. & Wakamatsu, K. (1989). Melanin chemistry and melanin precursors in melanoma. **Journal of Investigative Dermatology** **92**, 261-265.

Jamison, K.C., Padgett, G.A., Giesy, J.P. & Bell, T.G. (1993). Studies of adenine nucleotide biochemistry in the Chediak-Higashi syndrome. **Experimental and molecular pathology** **58 (1)**, 40-52.

Jimbow, K., Ishida, O., Ito, S., Hori, Y., Witkop Jr., C.J. & King, R.A. (1983). Combined chemical and electron microscopic studies of pheomelanosomes in human red hair. **Journal of Investigative Dermatology** **81**, 506-511.

Jimbow, K., Lee, S.K., King, M.G., Hara, H., Chen, H., Dakour, J. & Marusyk, H. (1993). Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. **Journal of Investigative Dermatology** **100**, S259-S268.

Jimbow, K., Oikawa, O., Sugiyama, S. & Takeuchi, T. (1979). Comparison of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in retinal and follicular melanocytes; role of vesiculo-globular bodies in melanosome differentiation. **Journal of Investigative Dermatology** **73**, 278-284.

Jouve, J. J., Herault, H., Tournade & Muh J.P. (1992). Determination by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection of free and conjugated N-acetyldopamine excretion in urine of children with neuroblastoma and nephroblastoma. **Journal of Chromatography** **574**, 9-15.

Kaplan, L.A. & Pesce, A.J. (1989). Urine analysis. (In: *Clinical Chemistry: Theory, analysis and correlation*. Second edition. St. Louis: C.V. Mosby. p.1124.).

Kidson, S.H., Richards, P.D.G., Rawoot, F. & Kromberg, J.G.R. (1993). An ultrastructural study of melanocytes and melanosomes in the skin and hair bulbs of rufous albinos. **Pigment Cell Research** **6**, 209-214.

King, R.A., Hearing, V.J., Creel, D.J. & Oetting, W.S. (1995). Albinism. (In: *Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (eds). The metabolic and molecular basis of inherited disease*. Seventh edition. New York: Mc Graw-Hill. p.4353-4380.)

King, R.A., Lewis, R.A., Townsend, D., Zelickson, A., Olds, D.P. & Brumbaugh, J. (1985). Brown oculocutaneous albinism. **Ophthalmology** **92**, 1496-1505.

King, R.A. & Olds, D.P. (1985). Hairbulb tyrosinase activity in oculocutaneous albinism: Suggestions of pathway control and block location. **American Journal of Medical Genetics** **20**, 49-55.

King, R.A., Townsend, D.W., Oetting, W., Summers, C.G., Olds, D.P., White, J.G. & Spritz, R.A. (1991). Temperature-sensitive tyrosinase associated with peripheral pigmentation in oculocutaneous albinism. **Journal of Clinical Investigation** **87**, 1046-1053.

King, R.A., Wirtschafter, J.D., Olds, D.P. & Brumbaugh, J. (1986). Minimal pigment: a new type of oculocutaneous albinism. **Clinical Genetics** **29**, 42-50.

King, R.A. & Witkop, C.J. (1976). Hairbulb tyrosinase activity in oculocutaneous albinism. **Nature** **263**, 69-71.

King, R.A. & Witkop, C.J. (1977). Detection of heterozygotes for tyrosinase-negative oculocutaneous albinism by hairbulb tyrosinase assay. **American Journal of Human Genetics** **29**, 164-168.

Kinnear, P.E., Barrie Jay, M.D. & Witkop, C.J. (1985). Albinism. **Survey of Ophthalmology** **30**, 75-101.

Körner, A. & Pawelek, J. (1982). Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in biosynthesis of melanin. **Science** **217**, 1163-1165.

Lavker, R.M., Cotsarelis, G., Wei, Z. & Sun, T. (1991). Stem cells of pelage, vibrissae and eyelash follicles: The hair cycle and tumor formation. **Annals of the New York Academy of Sciences** **642**, 214-225.

Lee, S., Nicholls, R.D., Bunday, S., Laxova, R., Musarella, M. & Spritz, R.A. (1994). Mutations of the p gene in oculocutaneous albinism, ocular albinism and Prader-Willi syndrome plus albinism. **New England Journal of Medicine** **330**, 529-534.

Leonard, L.J., Townsend, D. & King, R.A. (1985). Function of dopachrome oxidoreductase and metal ions in dopachrome conversion in the eumelanin pathway. **Biochemistry** **27**, 6156-6159.

Magenis, R.E., Toth-Fejel, S., Allen, L.J., Black, M., Brown, M.G., Budden, S., Cohen, R., Friedman, J.M., Kalousek, D., Zonana, J., Lacy, D., LaFranchi, S.,

Lahr, M., MacFarlane, J. & Williams, C.P.S. (1990). Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: Specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences. **American Journal of Medical Genetics** **35**, 333-349.

Mahadeo, R., Markowitz, J., Fisher, S. & Daum, F. (1991). Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis in children. **Journal of Pediatrics** **118**, 904-906.

Marshall, W.J. (1992). *Inherited metabolic diseases*. Second edition. St. Louis: Mosby, p.249-261.

Martin, A.M. (1993). *Oxford mediese woordeboek*. Eerste uitgawe. Oxford: Oxford University Press. 656p.

Martin, D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. & Granner, D.K. (1985). *Harper's review of biochemistry*. Twentieth edition. Los Altos: Lange Medical Publications, 718p.

Mathews, C.K. & van Holde, K.E. (1990). *Biochemistry*. Redwood City: Benjamin/Cummings Publishing Company. 1129p.

McClements, B.M., McDowell, I.F.W. & McCluskey, D.R. (1988). A case of dark urine, hyperpigmentation and hepatomegaly. **Irish Journal of Medical Science** **157**, 157.

Mizuno, Y. (1977). Simple gas chromatographic analysis of dopa and dopamine. **Clinica Chimica Acta** **74**, 11-19.

Muskiet, F.A.J., Fremouw-Ottevangers, D.C., van der Meulen, J., Wolthers, B.G. & de Vries, J.A. (1978). Determination of some L-3,4-

dihydroxyphenylalanine and dopamine metabolites in urine by means of mass fragmentography. **Clinical Chemistry** **24(1)**, 122-127.

Muskiet, F.A.J., Thomasson, C.G., Gerding, A.M., Fremouw-Ottevangers, D.C., Nagel, G.T. & Wolthers, B.G. (1979). Determination of catecholamines and their 3-O-methylated metabolites in urine by mass fragmentography with use of deuterated internal standards. **Clinical Chemistry** **25**, 453-460.

Mutirangura, A., Greenberg, F., Butler, M.G., Malcolm, S., Nicholls, R.D., Chakravarti, A. & Ledbetter, D.H. (1993). Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/ Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. **Human Molecular Genetics** **2**, 143-151.

Nance, W.E., Jackson, C.E. & Witkop, C.J. (1970). Amish albinism: A distinctive autosomal recessive phenotype. **American Journal of Human Genetics** **22**, 579-586.

Nantulya, F.N., Kitonyi, G.W., Kituuka, P.N. & Owade, J. (1990). Chediak-Higashi syndrome: A case report on an african infant. **East African Medical Journal** **67(9)**, 674-680.

Napolitano, A., Costantini, C., Crescenzi, O. & Prota, G. (1994). Characterization of 1,4-benzothiazine intermediates in the oxidative conversion of 5-S-cysteinyldopa to pheomelanins. **Tetrahedron Letters** **35**, 6365-6368.

Napolitano, A., Crescenzi, O. & Prota, G. (1993). Co-polymerization of 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid in melanogenesis: Isolation of a cross-coupling product. **Tetrahedron Letters** **34**, 885-888.

Napolitano, A., Memoli, S., Crescenzi, O. & Prota, G. (1996a). Oxidative polymerization of the pheomelanin precursor 5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine: A new hint to the pigment structure. **Journal of Organic Chemistry** **61**, 598-604.

Napolitano, A., Pezzella, A., Prota, G., Seraglia, R. & Traldi, P. (1996b). A reassessment of the structure of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid melanins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** **10**, 204-208.

Napolitano, A., Pezzella, A., Prota, G., Seraglia, R. & Traldi, P. (1996c). Structural analysis of synthetic melanins from 5,6-dihydroxyindole by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** **10**, 468-472.

Newsholme, E.A. & Leech, A.R. (1983). Metabolism of neurotransmitters. (In: Newsholme, E.A. & Leech, A.R. (eds). *Biochemistry for the medical sciences*. Chichester: John Wiley & sons. p.772-812.)

Nimmo, J.E., Hunter, J.A.A., Percy-Robb, I.W., Jay, B., Phillips, C.I. & Taylor, W.O.G. (1985) Plasma 5-S-cysteinyldopa concentrations in oculocutaneous albinism. **Acta Dermato-Venereologica** **65**, 169-171.

Nolte, L. (1997). M. Sc verhandeling: Die ontwikkeling van elektrospoei massaspektrometrie vir die bepaling van karnitienpalmitoietltransferase I aktiwiteit in fibroblaste en leukosiete. (83p).

Ortonne, J., Mosher, D.B. & Fitzpatrick, T.B. (1983). Vitiligo and other hypomelanoses of hair and skin. (In: Parrish, J.A. & Fitzpatrick, T.B. (eds.) *Topics in dermatology*. New York: Plenum Publishing Company, p.1-123.)

Ozaki, K., Maeda, H., Nishikawa, T., Nishimura, M. & Narama, I. (1994). Chediak-Higashi syndrome in rats: light and electron microscopical characterization of abnormal granules in beige rats. **Journal of Comparative Pathology** **110(4)**, 369-379.

Palumbo, P., d'Ischia, M. & Prota, G. (1987). Tyrosinase-promoted oxidation of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin. Isolation and characterization of oligomer intermediates. **Tetrahedron** **43**, 4203-4206.

Pavel, S. (1993). Dynamics of melanogenesis intermediates. **Journal of Investigative Dermatology** **100**, 162-165.

Pavel, S., Elzinga, H., Muskiet, F.A.J., Smit, J.M., Mulder, N.H. & Koops, H.S. (1986). Eumelanin-related indolic compounds in the urine of treated melanoma patients. **Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry** **24**, 167-173.

Pawelek, J.M. (1991). After dopachrome? **Pigment Cell Research** **4**, 53-62.

Perou, C.M. & Kaplan, J. (1993). Chediak-Higashi syndrome is not due to a defect in microtubule-based lysosomal mobility. **Journal of Cell Science** **106**, 99-107.

Pezzella, A., Napolitano, A., d'Ischia, M. & Prota, G. (1996). Oxidative polymerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid to melanin: a new insight. **Tetrahedron** **52**, 7913-7920.

Pinder, R.M., Brogden, R.N., Sawyer, P.R., Speight, T.M. & Avery, G.S. (1976). Levodopa and decarboxylase inhibitors: A review of their clinical pharmacology and use in the treatment of Parkinsonism. **Drugs** **11**, 329-377.

Prota, G. (1988). Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. **Medicinal Research Reviews** **8**, 525-556.

Prota, G. (1993). Regulatory mechanisms of melanogenesis: beyond the tyrosinase concept. **Journal of Investigative Dermatology** **100**, S156-161.

Prota, G., Rorsman, H., Rosengren, A.M. & Rosengren, E. (1977). Isolation of 2-S-cysteinyldopa and 2,5-S,S-dicysteinyldopa from the urine of patients with melanoma. **Experientia** **33**, 720-721.

Rausing, A. & Rosén, U. (1994). Black cartilage after therapy with levodopa and methyldopa. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine** **118**, 531-535.

Rodwell, V.W. (1985). Conversion of amino acids to specialized products. (In: Martin Jr., D.W., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. & Granner, D.K., (eds). Harper's Review of Biochemistry. 20th ed. California: Lange Medical Publications. p. 327.).

Reynolds, J.E.F. (1993). Martindale: The extra pharmacopoeia. 30th edition. London: Pharmaceutical Press, 2363 p.

Saito, N. & Morishima, T. (1991). Eumelanin and pheomelanin contents in hair and 5-S-cysteinyldopa and 5-hydroxy-6-methoxyindole-2-carboxylic acid levels in urine in Japanese oculocutaneous albinism. **Archives of Dermatological Research** **283**, 7-9.

Schinella, R.A., Greco, M.A., Cobert, B.L., Denmark, L.W. & Cox, R.P. (1980). Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis. **Annals of Internal Medicine** **92**, 20-23.

Schinella, R.A., Greco, M.A., Garay, S.M., Lackner, H., Wolman, S.R. & Fazzini, E.P. (1985). Hermansky-Pudlak syndrome: A clinicopathologic study. **Human Pathology** **16**, 366-376.

Scott, R.E., Ward, V.L., Grinstead, G.F., Stevens, B.S. & Wilson, D.M. (1988). Melanogenuria: Laboratory evaluation of the qualitative Thormahlen and Ferric Chloride tests and their clinical utility. **Clinical Chemistry** **34**, 582-585.

Seraglia, R., Traldi, P., Elli, G., Bertazzo, A., Costa, C. & Allegri, G. (1993). Laser desorption ionization mass spectrometry in the study of natural and synthetic melanins. **Biological Mass Spectrometry** **22**, 687-697.

Sharman, D.F. (1973). The catabolism of catecholamines. **British Medical Bulletin** **29(2)**, 110-115.

Smit, N.P.M., Pavel, S., Kammeyer, A. & Westerhof, W. (1990). Determination of catechol-O-methyltransferase activity in relation to melanin metabolism using high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. **Analytical Biochemistry** **190**, 286-291.

Smit, N., Tilgmann, C., Karhunen, T., Slingerland, R., Ulmanen, I., Westerhof, W. & Pavel, S. (1994). O-methylation of L-dopa in melanin metabolism and the presence of catechol-O-methyltransferase in melanocytes. **Pigment Cell Research** **7**, 403-408.

Stewart, R.M., Miller, S. & Gunder, M. (1983). Urinary 5-S-cysteinyl-dopa in Parkinsonism after dopa and carbidopa. **Acta Dermatovenereologica** **63**, 97-101.

Sugiyama, S. & Kukita, A. (1975). Melanocyte reservoir in the hair follicles during the hair growth cycle: An electron microscopic study. (In: Kabori, T. &

Montagna, W. (eds.) *Biology and disease of the hair*. Baltimore: University Park Press, 667p.).

Sugumaran, M. (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis. **Federation of European Biochemical Societies** 293, 4-10.

Szabo, G., Gerald, A.B., Pathak, M.A. & Fitzpatrick, T.B. (1972). The ultrastructure of racial colour differences in man. (In: Riley, V., (ed). *Pigmentation: Its genesis and biologic control*. New York: Meredith Corporation. p. 23-39.).

Thompson, A., Land, E.J., Chedekel, M.R., Subbarao, K.V. & Truscott, T.G. (1985). A pulse radiolysis investigation of the oxidation of the melanin precursors 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) and the cysteinyl dopas. **Biochimica et Biophysica Acta** 843, 49-57.

Tietz, N.W. (1970). *Fundamentals of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders. 983p.

Titus, D.C., August, T.F., Yeh, K.C., Eisenhandler, R., Bayne, W.F. & Musson, D.G. (1990). Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of carbidopa, levodopa and 3-O-methyldopa in plasma and carbidopa, levodopa and dopamine in urine using electrochemical detection. **Journal of Chromatography** 534, 87-100.

Todd, W.J. (1986). Effects of specimen preparation on the apparent ultrastructure of microorganisms. (In: Aldrich, H.C. & Todd, W.J., (eds). *Ultrastructure techniques for microorganisms*. New York: Plenum Press. p. 87).

Tortora, G.J. & Anagnostakos, N.P. (1987). *Principles of anatomy and physiology*. 5th ed. New York: Harper and Row Publishers. p.384, 385.

Urabe, K., Aroca, P., Tsukamoto, K., Mascagna, D., Palumbo, A., Prota, G. & Hearing, V.J. (1994). The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision. **Biochimica et Biophysica Acta** **1221**, 272-278.

Van Scott, E.J., Reinertson, R.P. & Steinmuller, R. (1957). The growing hair roots of the human scalp and morphologic changes therein following amethopterin therapy. **Journal of Investigative Dermatology** **29**, 197-204.

Vasiliades, J. (1976). Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex. **Clinical Chemistry** **11**, 1664.

Vincent, R.A. & Spicer, S.S. (1981). Giant dense bodies in fibroblasts cultured from beige mice with the Chédiak-Higashi syndrome. **American Journal of Pathology** **105**, 270-278.

Walmsley, R.N. & White, G.H. (1994). Inborn errors of metabolism. (In: Walmsley, R.N. & White, G.H. (eds). A guide to diagnostic clinical chemistry. Third edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 580-612.)

Weiss, L. ed. (1983). Histology: Cell and tissue biology. Fifth edition. New York: Elsevier Biomedical, 1196p.

Westerhof, W., Pavel, S., Kammeyer, A., Beusenbergh, F.D. & Cormane, R. (1987). Melanin-related metabolites as markers of the skin pigmentary system. **Journal of Investigative Dermatology** **89**, 78-81.

Whitby, L.G., Percy-Robb, I.W. & Smith, A.F. (1984). Inherited metabolic disorders. (In: Whitby, L.G., Percy-Robb, I.W. & Smith, A.F. (eds). Lecture notes on clinical chemistry. Third edition. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 418-430.)

White, J.G. & Clawson, C.C. (1980). The Chédiak-Higashi syndrome: The nature of giant neutrophil granules and their interaction with cytoplasm and foreign particulates. **American Journal of Pathology** **98**, 151-172.

Williams, C.A. & Frias, J.L. (1982). The Angelman ("Happy puppet") syndrome. **American Journal of Medical Genetics** **11**, 453-460.

Windhorst, D.B., Zelickson, A.S. & Good, R.A. (1968). A human pigmentary dilution based on a heritable subcellular structural defect - the Chediak-Higashi syndrome. **Journal of Investigative Dermatology** **50**, 9-18.

Wirestrand, L.E., Hansson, C., Rosengren, E. & Rorsman, H. (1985). Melanocyte metabolites in the urine of people of different skin colour. **Acta Dermatovenereologica** **65**, 345-348.

Witkop, C.J. (1971). Albinism. (In: Harris, H. & Hirschhorn, K. (eds). *Advances in Human Genetics*, vol. 2. New York: Plenum Press, 61-142.).

Witkop, C.J. (1979). Depigmentations of the general and oral tissues and their genetic foundations. **Alabama Journal of Medical Sciences** **16**, 331-343.

Witkop, C.J., Jr. (1983). Abnormalities of pigmentation. (In: Emery, A.E.H. & Rimoin, D.L., (eds). *Principles and practice of medical genetics*. Edinburgh: Churchill Livingstone. p. 622-624.).

Witkop Jr., C.J., White, J.G., Nance, W.E., Jackson, C.E. & Desnick, S. (1971). Classification of albinism in man. **Birth Defects** **7**, 13-25.

Witkop Jr., C.J., White, J.G., Nance, W.E. & Umber, R.E. (1972). Mutations in the melanin pigment system in man resulting in features of oculocutaneous

albinism. (In: Riley, V. (ed). *Pigmentation: Its genesis and biologic control*. New York: Meredith Corporation. p. 359-377.).

Witkop Jr., C.J., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B. (1983). Albinism and other disorders of pigment metabolism. (In: Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. & Brown, M.S., (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. 5th ed. New York: Mc-Graw-Hill. p.301-339.)

Witkop, C.J., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B. & King, R.A. (1989). Albinism. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. Sixth edition. New York: Mc Graw-Hill, p.2905-2938.).

Witkop, C.J., Quevedo, W.C., Fitzpatrick, T.B. & King, R.A. (1995). Albinism. (In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. & Valle, D. (eds). *The metabolic basis of inherited disease*. Sixth edition. New York: Mc Graw-Hill, p.2905-2938.).

Yamada, K., Walsh, N., Hara, H., Jimbow, K., Chen, H. & Ito, S. (1992). Measurement of eumelanin precursor metabolites in the urine as a new marker of melanoma metastasis. **Archives of Dermatology** **128**, 491-494.

Yamamoto, O. & Bhawan, J. (1994). Three modes of melanosome transfer in caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. **Pigment Cell Research** **7**, 158-169.

Zelickson, A.S. (1967). Melanocyte, melanin granule and Langerhans cell. (In: Zelickson, A.S. (ed). *Ultrastructure of normal and abnormal skin*. London: Henry Kimpton. p.163-181.).

Zhao, H., Boissy, Y.L., Abdel-Malek, Z., King, R.A., Nordlund, J.J. & Boissy, R.E. (1994). On the analysis of the pathophysiology of Chédiak-Higashi

syndrome: Defects expressed by cultured melanocytes. **Laboratory Investigation 71(1), 25-34.**

Afkortingslys

Ag/AgCl	Silwer/Silwerchloried
BSTFA	N, O-bis(trimetielsiliel)trifluoroasetamied
C ₁₈	Koolstofkettings met lengte van 18 koolstofatome
°C	Grade celcius
Karbidopa	(-)-L- α -hidrazino-3,4-dihidroksi- α -metielbenseenpropioonsuur
°C/min.	Grade celcius per minuut
DA	Dopamien
DHI	Dihidroksi-indool
DHIK	Dihidroksi-indoolkarboksielsuur
5,6DMI2K	5,6-Dimetoksi-indool-2-karboksielsuur
DOPAC	Dihidroksifenielasetaat
ES-MS	Elektrosproei-massaspektrometrie
eV	Elektronvolt
g	Gram
g/l	Gram per liter
g/mol	Gram per mol
GC-MS	Gaschromatografie-massaspektrometrie
GC	Gaschromatografie
HCl	Waterstofchloried
4-HFA	4-Hidroksifenielasetaat
4-HFL	4-Hidroksifenellaktaat
5H6MI	5-Hidroksi-6-metoksi-indool

6H5MI	6-Hidroksi-5-metoksi-indool
5H6MI2K	5-Hidroksi-6-metoksi-indool-2-karboksielsuur
6H5MI2K	6-Hidroksi-5-metoksi-indool-2-karboksielsuur
6H5MIK	6-Hidroksi-5-metoksi-indool-karboksielsuur
HPLC	Hoë druk vloeistofchromatografie
HVA	Homovanilliensuur
ID	Interne deursnee
I.S.	Interne standaard
Karbidopa	(-)-L- α -hidrazino-3,4-dihidroksi- α -metielbenseenpropioonsuur
KOMT	Katesjol-O-metieltransferase
kV	Kilovolt
L	Liter
L-DOPA	3,4-Dihidroksifenielalanien
L/h	Liter per uur
M	Mol per kubieke desimeter
m	Meter
MAO	Mono-amien-oksidade
mbar	Millibar
mg	Milligram
mg/g	Milligram per gram
mg/l	Milligram per liter
mg%	Milligram persent

min.	Minuut
ml	Milliliter
ml/min.	Milliliter per minuut
mm	Millimeter
mM	Millimol per liter
mmol/l	Millimol per liter
mol/mmol	Mol per millimol
mmol/mol	Millimol per mol
MS-MS	Tandem massaspektrometrie
MS	Massaspektrometrie
m/v	Massa per volume
mV	Millivolt
m/z	Massa tot lading verhouding
N	Normaal
Na ₂ EDTA	Etileendiamien-tetra-asynsuur dinatrium sout
Na ₂ HCO ₃	Natriumbisulfiet
NaOH	Natriumhidroksied
ng/ml	Nanogram per milliliter
nm	Nanometer
OKA	Okulokutaneuse albinisme
OMD	O-metioldopa
pH	Log van die waterstofioonkonsentrasie
5SSD	5-S-sisteïenioldopa

Tris	2-Amino-2-(hidroksi-metiel)-1,3-propandiol
TMCS	Trimetielchlorosilaan
UV	Ultra-violet
V	Volt
VLA	3-Metoksi-4-hidroksifeniellaktaat
VMA	4-Hidroksi-3-metoksi-amandelsuur
v/v	volume per volume
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogram per milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Glossarium

Anemie

'n Vermindering in die hoeveelheid suurstofdraende pigment, hemoglobien, in die bloed.

Desmosoom

'n Area van kontak tussen twee aangrensende selle. Die selmembraan by 'n desmosoom is verdik en fyn vesels (tonofibrille) strek van die desmosoom tot in die sitoplasma.

Elektroënsefalografie

Die registrasie van elektriese aktiwiteit in verskillende dele van die brein in die vorm van 'n grafiek wat bekend staan as 'n elektroënsefalogram (EEG).

Elektromiografie

'n Deurlopende opname van die elektriese aktiwiteit van 'n spier deur middel van elektrodes wat in die spiervesels geplaas word.

Fotofobie

'n Abnormale onverdraagsaamheid vir lig waar blootstelling aan lig intense ongemak veroorsaak met die gevolg dat ooglede styf toegeknyp word en ander reaksies, om lig te vermy, getoon word.

Fovea

'n Klein induiking in die vorm van 'n vlak put in die retina aan die agterkant van die oog. Dit is die area in die retina met die skerpste visie.

Geelsug (Ikterus)

'n Geel verkleuring van die vel of wit van die oë. 'n Aanduiding van te veel bilirubien ('n galkleurstof) in die bloed.

Haarbulbus

Die verdikte gedeelte van die haarwortel wat 'n matriks verdelende selle bevat.

Haarpapil

'n Dermisuitsteeksel wat deur die basis van die haarulbus omring word. Dit bevat die haarvate wat bloed aan die groeiende haar lewer.

Hepatomegalie

Abnormale vergroting van die lewer.

Hipoplasia van die fovea

Onderontwikkeling van die fovea.

Infiltrasie

'n Abnormale indringing van 'n substans (infiltraat) in 'n sel, weefsel of orgaan. Voorbeelde van infiltrate is bloedselle, kankerselle, vet, stysel of kalsium-en magnesiumsoute.

Makula

'n Klein anatomiese gebied³ wat van die omliggende weefsel onderskei kan word. Die makula lutea is die geel vlek op die retina aan die agterkant van die oog, wat die grootste konsentrasie keëls omring.

Marasmus (infantiele atrofie)

'n Ernstige wegkwyning by babas, wanneer liggaamsmassa laer as 75% van die verwagte vir die ouderdom is. Die baba lyk bleek, apaties, toon gebrek aan subkutane vet, en het 'n subnormale temperatuur.

Mikrosefalie

Abnormale kleinheid van die kop in vergelyking met die res van die liggaam. 'n Abnormale toestand waar die brein nie ten volle ontwikkel is nie.

Miopia (Bysiendheid)

Die toestand waar parallelle ligstrale aan die voorkant van die retina gefokus word. Voorwerpe verder as ses meter van die oog vertoon dof en kan nie deur akkommodasie verskerp word nie.

Neuropatie

Enige siekte van die perifere senuwees, wat gewoonlik swakheid en doodsheid veroorsaak.

Neutropenie

'n Vermindering in die aantal neutrofiel, 'n soort witbloedsel, in die bloed. Dit lei tot 'n verhoogde vatbaarheid vir infeksies.

Nistagmus

Vinnige, onwillekeurige bewegings van die oë wat van kant tot kant kan wees of op en af, of roterend.

Optiese chiasma (Optiese kommissuur)

Die x-vormige struktuur wat gevorm word deur die twee optiese senuwees, wat na agter van die oogballe loop om in die middellyn onder die brein te ontmoet, naby die pituitêre klier. Senuwesels van die nasale kant van die retina van elke oog kruis om aan te sluit by vesels van die laterale kant van die retina van die teenoorgestelde oog. Die optiese bane wat volg uit die aansluiting loop na agter na die oksipitale lobbe.

Optiese skyf (Optiese papilla)

Die begin van die optiese senuwee, waar senuwesels van die stafies en keëls die oogbal verlaat.

Parkinsonisme

'n Aandoening wat gewoonlik bejaarde en middeljarige mense aantast. Dit word gekenmerk deur tremor, rigiditeit en 'n gebrek aan spontane bewegings. Die eerste en prominentste simptome is tremor, wat dikwels een hand aantast, en dan eers na die been aan dieselfde kant en dan na ander ledemate versprei. Tremor is die duidelikste sigbaar in rustende ledemate. Parkinsonisme is 'n siekte wat die basale ganglia van die brein aantast, en in baie gevalle kan geen oorsaak gevind word nie.

Rekenaar tomografie skandering

'n Tegniek van diagnostiese radiografie waarvolgens 'n snit van sagte liggaamswefsel opgeneem word met 'n x-straalskandeerder. Hierdie rekords word met 'n rekenaar geïntegreer ten einde 'n beeld van die deursnit te verkry.

Serebrale atrofie

Atrofie is die wegkwyning van 'n normaal ontwikkelde orgaan of weefsel weens seldegenerasie. Serebrale atrofie is die wegkwyning van die grootste en mees ontwikkelde deel van die brein, wat bestaan uit die twee serebrale hemisfere.

Spastisiteit

Weerstand teen die passiewe beweging van 'n ledemaat wat maksimaal is aan die begin van die beweging en meeges wanneer druk uitgeoefen word. Dit is 'n simptome van skade aan die kortikospinale bane in die brein of rugmurg. Dit gaan gewoonlik gepaard met swakheid van die aangetaste ledemaat.

Spastiese verlamming

Swakheid van 'n ledemaat of ledemate geassosieer met 'n toename in refleksiwiteit. Dit lei tot 'n weerstand teen passiewe beweging van die ledemaat. Dit word veroorsaak deur 'n siekte wat die senuwesels van die kortikospinale baan aantast, wat in 'n gesonde persoon nie slegs bewegings inisieer nie, maar ook die strekreflekse beperk sodat beweging kan plaasvind.

Splenomegalie

Vergroting van die milt.

Strabismus (Heterotropie)

Enige abnormale inlynstelling van die twee oë. Strabismus is gewoonlik horisontaal.

Trombositopenie

'n Afname in die aantal bloedplaatjies in die bloed. Dit veroorsaak bloeding in die vel, spontane kneusing en langdurige bloeding na 'n besering. Dit kan ontstaan weens 'n onvermoë om plaatjies te produseer, of uitermatige vernietiging van plaatjies.