Archive of SID

شیوع بیماری فنیل کتونوری در بین مددجویان آسایشگاه‌های بهزیستی اصفهان

صادق ولیان بروجنی[1]، الهام براهیمی، ماریا شامرادگلی، حسن معینی، مهدی حسینی مزینانی

چکیده مقاله

مقدمه. کمبود آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز (Phenyalanine Hydroxylase, PAH) منجر به بروز بیماری ژنتیک فنیل کتونوری (Phenylketonuria, PKU) می‌شود که درصورت عدم تشخیص و درمان به موقع (در هفته اول تولد) منجر به عقب ماندگی ذهنی شدید غیر قابل برگشت می‌گردد. در این مطالعه برای اولین بار فراوانی بیماری فنیل کتونوری در بین مددجویان دارای معلولیت ذهنی در آسایشگاه‌های مختلف بهزیستی استان اصفهان مورد بررسی قرار گرفته است.

روشها. در غربالگری برای بیماری PKU ، تعداد ۱۵۴۱ نفر از مددجویان مورد مطالعه ژنتیکی قرار گرفتند و از تعداد ۶۱۱ نفر از افراد فوق که مشکوک به این بیماری بودند، نمونه‌گیری به عمل آمد. با استفاده از تست اختصاصی تشخیصی گاتری (Gutheri Test) میزان فنیل‌آلانین خون افراد مورد ارزیابی کیفی قرار گرفت. سپس میزان فنیل‌آلانین نمونه‌های مثبت، توسط HPLC به صورت کمی تعیین شد.

نتایج. از بین ۶۱۱ نفر نمونه مورد بررسی ۳۳ نمونه مثبت برای بیماری فنیل کتونوری شناسایی گردیدند. بررسی کمی میزان فنیل‌آلانین در این افراد نشان داد که ۶۱درصد دارای بیماری فنیل کتونوری نوع کلاسیک، ۳۶درصد نوع متوسط و ۳درصد نوع ملایم می‌باشند. بررسی ارتباط فامیلی والدین افراد بیمار نشان داد که در ۶۸درصد موارد، والدین خویشاوند درجه سه می‌باشند.

بحث. ارقام بدست آمده از این بررسی نشان می‌دهند که ۲/۱ درصد از کل مددجویان تحت مراقبت مورد بررسی مبتلا به بیماری فنیل کتونوری می‌باشند. فراوانی این بیماری در مددجویان دارای معلولیت ذهنی با علت نامشخص ۵/۲ درصد می‌باشد. ارقام بدست آمده در این مطالعه نشان دهنده شیوع نسبتاً بالای بیماری فنیل کتونوری در بین معلولین ذهنی اصفهان در مقایسه با ارقام گزارش شده در سایر نقاط دنیا دارد. وجود رابطه خویشاوندی بین والدین اکثر بیماران نشانگر اهمیت اینگونه ازدواج‌ها در شیوع بیماری فنیل کتونوری در اصفهان می‌باشد.

● *واژه‌های کلیدی: فنیل کتونوری، فنیل آلانین هیدرکسیلاز، تست گاتری، غربالگری.*

مقدمه

فنیل کتونوری (Phenylketonuria, PKU) یک بیماری ارثی است که ناشی از نقص در فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز (Phenylalanine Hydroxylase, PAH) کبدی می‌باشد (۳-۱). از ویژگی‌های این بیماری افزایش سطح فنیل آلانین خون و بروز اختلالات ذهنی غیر قابل برگشت شدید (با ضریب هوشی زیر ۵۰) در افراد مبتلا می‌باشد که بعضاً همراه با میکروسفالی، صرع، و مشکلات رفتاری خواهد بود. تشخیص به موقع بیماری در هفته‌های اول زندگی و کنترل سطح فنیل آلانین خون می‌تواند منجر به جلوگیری کامل از عوارض بیماری شود (۸-۴). در نوزادان مبتلا کنترل رژیم غذایی از لحاظ میزان فنیل آلانین مناسبترین روش درمانی می‌باشد. در این ارتباط استفاده از شیرهای مخصوص فاقد اسید آمینه فنیل آلانین به جای شیر مادر با شیرهای دیگر توصیه می‌گردد. سطح فنیل آلانین خون درحالت طبیعی ۴-۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر می‌باشد و مقادیر بالای ۴ میلی‌گرم در دسی‌لیتر غیر طبیعی درنظر گرفته می‌شوند. در افراد بیماری بسته به شدت بیماری، سطح فنیل آلانین خون بین ۳۰-۷ میلی‌گرم در لیتر متفاوت خواهد بود (۹، ۱۰). امروزه در بسیاری از کشورها تشخیص بیماری فنیل کتونوری به صورت روتین در آزمون‌های غربالگری نوزادان انجام می‌شود. در این آزمون‌ها اندازه‌گیری فنیل آلانین خون با استفاده از آزمایش گاتری و یا روش‌های کروماتوگرافی و فلئورومتری برروی خون پاشنه پا نوزاد صورت می‌گیرد(۹، ۱۰).

شیوع بیماری فنیل کتونوری در نقاط مختلف دنیا متفاوت می‌باشد (۱، ۱۱). حداکثر فراوانی در ترکیه و ایرلند به ترتیب ۱/۲۶۰۰ و ۱/۴۵۰۰ (۱۴ و ۱۵) گزارش شده است و حداقل آن در ژاپن و یهودیان اشکنازی به ترتیب ۱/۱۴۳۰۰۰ و ۱/۲۰۰۰۰۰ می‌باشد (۱۲، ۱۳).

در این مطالعه شیوع بیماری فنیل کتونوری در آسایشگاه‌های معلولین ذهنی اصفهان مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها

بیماران مورد بررسی در این مطالعه از بین مددجویان دارای معلولیت ذهنی (سنین ۳۰-۷ سال) در آسایشگاه‌های بهزیستی انتخاب شدند. برای این منظور در هر آسایشگاه، ابتدا پرونده کلیه افراد مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه افراد دارای علت مشخص معلولیت ذهنی و یا دارای اختلال ژنتیکی مشخص نظیر سندرم‌های داون، فریاد گربه و غیره از مطالعه حذف شدند و نمونه‌گیری از سایر افراد دارای عقب ماندگی ذهنی بدون علت مشخص صورت پذیرفت. ابتدا به هر فرد کد خاصی اختصاص داده شد،

۱- بخش ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان.

www.SID.ir

Archive of SID

سپس از افراد در دو مرحله نمونه‌گیری انجام شد. در مرحله اول از هر فرد چند قطره خون به صورت سه لکه مجزا برروی کاغذ کروماتوگرافی (واتمن نمره ۳) با استفاده از لانست جمع‌آوری گردید. لکه‌ها طوری تهیه شدند که علاوه بر اشباع شدن کاغذ، با یکدیگر تداخل ننمایند. سطح فنیل آلانین نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از آزمون گاتری به صورت کیفی بررسی شد. در مرحله دوم، افراد دارای تست گاتری مثبت مورد نمونه‌گیری مجدد قرار گرفتند. در این مرحله مقدار ۱۰-۵ میلی‌لیتر خون وریدی از افراد جمع‌آوری و در دو لوله مجزا یکی حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و دیگری بدون ماده ضد انعقاد جمع‌آوری گردیدند.

نمونه‌های خون پس از انتقال به آزمایشگاه در لوله‌های مجزا تقسیم شدند و یکسری از لوله‌ها سانتریفوژ شد (۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و پلاسما یا سرم آنها جدا شد و مورد بررسی کمی فنیل آلانین قرار گرفت. قابل ذکر است که در هر دو مرحله نمونه‌گیری، از طریق مسئولین محترم آسایشگاه‌ها با خانواده مددجویان هماهنگی لازم به عمل آمد و بعضی از خانواده‌ها در هنگام نمونه‌گیری (خصوصاً در مرحله دوم) در محل حضور داشتند. همینطور نمونه‌گیری توسط کارشناسان مجرب انجام شد.

میزان فنیل آلانین خون افراد ابتدا به صورت کیفی با استفاده از آزمون گاتری (Guthrie Test) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۴). از مزایای استفاده از آزمون مزبور قابلیت انجام آن برروی مقدار بسیار کمی نمونه (چند قطره خون) در مدت کوتاهی می‌باشد.

همینطور می‌توان به طور همزمان تعداد بسیاری نمونه (۱۰۰-۵۰) را بررسی نمود. درضمن هزینه انجام آزمون بسیار پائین (حدود هزار ریال برای هر نمونه) می‌باشد. انجام آزمون براساس روش استاندارد ارائه شده توسط گاتری صورت گرفت (۱۱). در این آزمایش نمونه‌های دارای فنیل آلانین بالای ۷ میلی‌گرم در دسی‌لیتر مثبت تلقی و جهت خونگیری مجدد انتخاب شدند. پس از خونگیری مجدد، میزان فنیل آلانین نمونه‌ها به صورت کمی با استفاده از دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. در این روش نیز از سرم یا پلاسمای دارای مقادیر مشخص فنیل آلانین به عنوان استاندارد استفاده شد. در هر دو روش، نمونه‌های استاندارد با اضافه نمودن فنیل آلانین به خون، سرم یا پلاسما در غلظت نهایی ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در دسی لیتر تهیه شدند.

نتایج

شیوع بیماری فنیل کتونوری در بین مددجویان تحت مراقبت در آسایشگاه‌های مختلف شهر اصفهان و چند شهر مجاور واقع در استان اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. در کل تعداد ۱۵۴۱ پرونده در آسایشگاه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. افراد مورد بررسی در سنین ۷ تا ۳۰ سال و در دو جنس مختلف بودند. در بین افراد مورد بررسی تعداد ۹۳۰ نفر که دارای سندرم‌های ژنتیکی شناخته شده مشخص و غیر مرتبط با بیماری PKU نظیر داون، ترنر و غیره بودند، حذف شدند. به علاوه هیچکدام از این افراد فنوتیپ‌های مرتبط با فنیل کتونوری نظیر کاهش پیگمان‌های پوست و مو را دارا نبودند. ۶۱۱ نفر باقیمانده که بعضاً به وضوح فنوتیپ فنیل کتونوری را نشان می‌دادند و فاقد هرگونه علت مشخصی برای عقب ماندگی ذهنی بودند، مورد نمونه‌گیری اولیه قرار گرفتند و سطح فنیل آلانین خون آنها با استفاده از آزمون کیفی گاتری مورد بررسی قرار گرفت (به بخش مواد و روش‌ها مراجعه شود). درمیان افراد آزمایش شده، تعداد ۳۳ نفر دارای سطح بالای فنیل آلانین (بالای ۷ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) بوده که از لحاظ آزمون گاتری مثبت تلقی می‌شوند. مقایسه فراوانی افراد بیمار در آسایشگاه‌های مختلف نشان دهنده حداکثر شیوع بیماری در آسایشگاه‌های اصفهان (۳۹٪) و حداقل شیوع بیماری در آسایشگاه تیران (۳٪) می‌باشد.

با توجه به اینکه در آزمون گاتری مثبت بودن نمونه‌ها صرفاً براساس مقایسه نسبی آنها با نمونه‌های استاندارد صورت می‌پذیرد، مقدار فنیل آلانین خون تنها به صورت کیفی قابل اندازه‌گیری است. از اینرو به منظور دسته‌بندی افراد مثبت از لحاظ میزان دقیق فنیل آلانین خون، نیاز به تعیین مقدار فنیل آلانین نمونه‌ها به صورت کمی می‌باشد. بعلاوه، بررسی کمی میزان فنیل آلانین، میزان دقت آزمون گاتری انجام شده برروی نمونه را تأیید و نتایج مثبت کاذب احتمالی را مشخص می‌نماید. در این مطالعه بررسی میزان فنیل آلانین افراد در نمونه‌های سرم و پلاسما با استفاده از HPLC مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. سپس افراد مثبت براساس میزان فنیل آلانین سرم دسته‌بندی شدند. ۶۰٪ افراد دارای بیماری فنیل کتونوری نوع کلاسیک، ۳۶٪ نوع متوسط و ۳٪ نوع ملایم بوده‌اند.

بیماری فنیل کتونوری یک بیماری اتوزومی مغلوب می‌باشد و بروز آن تنها درحالت هموزیگوت بودن فرد برای آلل‌های جهش یافته ژن فنیل آلانین هیدروکسیلاز (حضور همزمان دو آلل جهش یافته) صورت می‌گیرد. مهمترین عامل هموزیگوسیتی صفات مغلوب در انسان ازدواج‌های خویشاوندی می‌باشند. از اینرو در این قسمت از مطالعه ارتباط ازدواج‌های خویشاوندی و بروز بیماری فنیل کتونوری در بین مددجویان مورد مطالعه بررسی گردید. ۶۸ درصد از بیماران حاصل ازدواج‌های درجه ۳ (دختر عمو/پسر عمو، دختر دائی/پسر عمه و بالعکس) می‌باشند. در این ازدواج‌ها ضریب خویشاوندی افراد که نشان دهنده میزان آلل‌های مشترک بین آنها می‌باشد برابر ۱/۸ و ضریب هم خونی در فرزندان آنها ۱/۱۶ است. به عبارتی، از هر ۱۶ لوکوس (جایگاه ژنی) در این افراد، یک لوکوس هموزیگوت (خالص) می‌باشد. از اینرو چنانچه انتظار می‌رود ازدواج‌های خویشاوندی سهم عمده‌ای در شیوع بیماریهای ارثی، خصوصاً بیماری اتوزومی مغلوب فنیل کتونوری دارد.

بحث

در این مطالعه برای اولین بار شیوع بیماری ژنتیکی فنیل کتونوری در آسایشگاه‌های بهزیستی استان اصفهان مورد مطالعه قرار گرفته است. به این منظور تعداد ۱۵۴۱ نفر از مددجویان آسایشگاه مختلف بهزیستی در

www.SID.ir

Archive of SID

اصفهان و هفت شهر حومه مورد بررسی قرار گرفتند. علیرغم محدود بودن تعداد بیماران، ارقام بدست آمده از این بررسی نشان می‌دهند که ۲/۱ درصد از کل مددجویان تحت مراقبت در آسایشگاه‌های معلولین ذهنی مورد مطالعه مبتلا به بیماری فنیل کتونوری می‌باشند. فراوانی این بیماری در بین مددجویان دارای معلولیت ذهنی با علت ناشناخته ۵/۲ درصد می‌باشد. مقایسه فراوانی بیماری در آسایشگاه‌های مختلف مورد مطالعه نشانگر حداکثر شیوع بیماری در شهر اصفهان و حداقل در شهر تیران است. فراوانی بیماری فنیل کتونوری در بین مددجویان معلولین ذهنی در کشورهای دیگر حدود ۳-۲ درصد گزارش شده است(۶) که نسبتاً کمتر از ارقام بدست آمده در این مطالعه می‌باشد.

فراوانی بیماری فنیل کتونوری ناشی از علل متعددی از جمله آلودگی‌های محیطی، ازدواج‌های خویشاوندی و غیره می‌باشد که بررسی آنها می‌تواند به جلوگیری از شیوع بیماری کمک نماید. در این مطاله به عنوان اولین عامل در شیوع بیماری فنیل کتونوری، نقش ازدواج‌های خویشاوندی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ارتباط ازدواج‌های خویشاوندی و شیوع بیماری فنیل کتونوری در جمعیت مورد مطالعه نشان داد که بخش بزرگی از بیماران (۶۸ درصد) حاصل ازدواج‌های خویشاوندی درجه سه (دختر عمه/پسر دائی، دختر عمو/پسر عمو، دختر خاله/پسر خاله) می‌باشند. از اینرو ازدواج‌های خویشاوندی به عنوان یک عامل اساسی در شیوع بیماری مزبور در آسایشگاه‌های اصفهان مطرح می‌باشد، که لازم است در پیشگیری از بیماری فوق مورد توجه خاص قرار گیرد. اصولاً ازدواج‌های خویشاوندی منجر به افزایش هموزیگوسیتی (خالص شدن لوکوس‌ها) در جمعیت می‌شوند. از اینرو لازم است ضمن افزایش آگاهی عمومی از خطرات ناشی از ازدواجهای فامیلی، مردم ترغیب به عدم انجام چنین ازدواجهایی گردند. این مسئله زمانی که یک بیماری ژنتیک شناخته شده نظیر فنیل کتونوری در خانواده‌ای وجود دارد باید با جدیت هرچه بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

هرچند مطالعه حاضر صرفاً محدود به مددجویان تحت مراقبت در آسایشگاه‌های بهزیستی می‌باشد ولی می‌تواند تا حدود زیادی وضعیت بیماری را در کل جمعیت اصفهان نشان دهد. با توجه به اینکه بیماری فنیل کتونوری از جمله بیماری‌های متابولیکی می‌باشد که پیشگیری از آن به طور ساده و با هزینه بسیار پائین امکان‌پذیر می‌باشد، از اینرو انجام یک آزمون غربالگری عمومی برای تشخیص به موقع بیماری در جامه ایران ضروری می‌باشد. بعلاوه، مطالعه مولکولی جهش‌های ژن آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز و تعیین جهش‌های شایع ژن مزبور به منظور راه‌اندازی یک روش مولکولی مناسب برای تشخیص افراد ناقل و تشخیص قبل از تولد بیماری ضروری می‌باشد. اکنون مطالعه مولولی بیماری مزبور در دست انجام می‌باشد.

قدردانی و تشکر

بدینوسیله از مسئولین محترم بهزیستی استان اصفهان و همچنین از مسئولین و کارکنان محترم آسایشگاه‌های مددجویان بهزیستی و والدین محترم مددجویان که در تهیه نمونه ما را یاری نمودند تشکر فراوان می‌گردد. هزینه این مطالعه توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اصفهان در غالب طرح پژوهشی ۷۹۰۲۰۵ تأمین شده است، که بدینوسیله قدردانی و تشکر فراوان می‌گردد.

مراجع

1- *Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, Chang TM, Scriver CR A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase Proc Natl Acad Sci USA 1999, 96: 2339-44.*

2- *Vallian S, Shamoradgoli, M. Phenyalanie hydroxylase (PAH) deficiency and its diagnostic value. Tashkhis Azmayeshgahi, 2001, 16, 37-43.*

3- *Weglage J, Ullrich K, Pietsch M, Funders B, Zass R, Koch HG Untreated non-phenylketonuric-hyperphenylalaninaemia: intellectual and neurological outcome. Eur J Pediatr 155 Suppl 1996, 1: S26-8.*

4- *Brenton DP, Tarn AC, Cabrera-Abreu JC, Lilburn M. Phenylketonuria: treatment in adolescence and adult life. Eur. J. Pediatr, 1996; 158: 46-54.*

5- *DiLella AG, Kwok SC, Ledley FD, Marvit J., Woo SL. Molecular structure and polymorphic map of the human phenylalanine hydroxylase gene. Biochemistry, 1986; 25: 743-9.*

6- *Kwok SC, Ledley FD, DiLella AG, Robson KJ, Woo SL Nucleotide sequence of a full-lenght complementary DNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. Biochemistry, 1985, 24: 556-61.*

7- *Villasana D, Butler IJ, Williams JC, Roongta SM, Neurological deterioration in adult phenylketonuria. J Inherit Metab Dis, 1989, 12: 451-7.*

www.SID.ir

Archive of SID

8- Waisbren SE, Chang P, Levy HL, Shifrin H, Allred E, Azen C, de la Cruz F, Hanley W, koch R, Matalon R, Rouse B Neonatal neurological assessment of offspring in maternal phenylketonuria. J Inherit Metab Dis 1998, 21: 39-48.

9- Sarkissian CN, Shao Z, Blain F, Peevers R, Su H, Heft R, Chang TM, Scriver CR, A different approach to treatment of phenylketonuria: phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 2339-44.

10- Ayares D and D'Arcy A. Alpha-lac: another diet supplement on the horizon. National PKU News, 1999, 10(3): 2.

11- Scriver CR (1998) Commentary on: A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, by Robert Guthrie and Ada Susi, Pediatrics 1963; 32318-43. Pediatrics (S): 236-7.

12- Krause W, Halminski M, McDonald L, Dembure P, Salvo R, Freides D, Elsas L Biochemical and neuropsychological effects of elevated plasma phenylalanine in patients with treated phenylketonuria. A model for the study of phenylalanine and brain function in man. J Clin invest 1985, 75: 40-8.

13- Guldberg P, Rey F, Zschocke J, Romano V, Francois B, Michiels L, Ullrich K, Hoffmann GF, Burgard P, Schmidt H, Meli C, Riva E, Dianzani I, Ponzone A, Rey J, Guttler F, A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype Am J Hum Genet, 1998, 63: 71-9.

14- Rohr FJ, Allred EN, Turner M, Simmons J, Levy HL Use of the Guthrie bacterial inhibition assay to monitor blood phenylalanine for dietary treatment of phenylketonuria. Screening, 1996; 4, 205-211.

www.SID.ir