Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۹ ، شماره ۳، خرداد ۱۳۹۰، ۱۷۸-۱۶۸

تعیین فعالیت آنزیم تیمیدین فسفریلاز گلبول‌های سفید و تیمیدین پلاسما در بیماران MNGIE به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (RP-HPLC)

شهلا رضایی[1]، مسعود صالحی‌پور[2]
ابوالفضل گلستانی[1]
صفورا ورداسبی جویباری[1]
شهریار نفیسی[3]، محمود دوستی[1]
تقی گلمحمدی[1*]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، تهران، ایران.
۳- گروه مغز و اعصاب داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، بلوار کشاورز، خیابان قدس، خیابان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی تلفن: ۰۹۱۲-۲۹۷۴۸۹۰
email: golmoham@sina.tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۷/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۰۴

چکیده

زمینه و هدف: تیمیدین فسفریلاز (TP) تبدیل تیمیدین به تیمین را کاتالیز می‌کند. Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy (MNGIE) یک بیماری اتوزومی مغلوب است که در نتیجه جهش در ژن هسته‌ای TP، از دست رفتن شدید فعالیت آنزیم و تجمع تیمیدین در پلاسما ایجاد می‌گردد. تظاهرات بالینی این بیماری در مراحل ابتدایی قابل تشخیص نمی‌باشند. در افراد مشکوک به MNGIE تعیین فعالیت تیمیدین فسفریلاز در گلبول‌های سفید و اندازه‌گیری مقدار تیمیدین پلاسما ارزش تشخیصی دارند. ***روش بررسی:*** روش‌هایی که تا به‌حال برای اندازه‌گیری فعالیت تیمیدین فسفریلاز و میزان تیمیدین پلاسما مورد استفاده قرار گرفته‌اند از سرعت، دقت و صحت کافی برخوردار نبوده‌اند. ما فعالیت آنزیم تیمیدین فسفریلاز در گلبول‌های سفید بیماران دارای علایم بالینی MNGIE و افراد کنترل را به روش RP-HPLC سنجش کردیم. تیمیدین پلاسما نیز به‌همین روش اندازه‌گیری شد. ***یافته‌ها:*** در تحقیق ما غلظت تیمیدین پلاسمای افراد بیمار بیش از سه میکرومول بر لیتر و در افراد سالم غیر قابل اندازه‌گیری و پایین‌تر از حد اندازه‌گیری دستگاه ما بود. فعالیت آنزیمی در افراد بیمار کمتر از ۵٪ افراد کنترل بود (۱۴±۴nmol/h/mg در مقابل ۵۲۵±۱۶۵nmol/h/mg با P<۰/۰۵). این نتایج یک الگوریتم تشخیص قطعی را بر اساس اندازه‌گیری تیمیدین پلاسما یا فعالیت تیمیدین فسفریلاز در گلبول‌های سفید و یا هر دو ارایه کردند. ***نتیجه‌گیری:*** ما یک روش سریع و دقیق را برای سنجش فعالیت آنزیم به‌روش RP-HPLC در ایران راه‌اندازی کردیم و توانستیم مقادیر مرجعی را برای میزان تیمیدین پلاسما و میزان فعالیت آنزیم TP برای بیماران ایرانی به‌دست آوریم.

کلمات کلیدی: تیمیدین فسفریلاز، تیمیدین، MNGIE، RP-HPLC.

مقدمه

Mitochondrial NeuroGastroIntestinal Encephalomyopathy (MNGIE) یک اختلال اتوزومی مغلوب همراه با اختلال در DNAی میتوکندری (mtDNA) است.[1-4] در سال ۱۹۷۶ اولین بیمار MNGIE تحت عنوان میوپاتی اسکلتی- چشمی همراه با میتوکندری‌های غیر طبیعی ماهیچه و کبد (Congenital oculoskeletal myopathy with abnormal muscle and liver mitochondria) توسط Okamura گزارش شد. در سال ۱۹۹۴ بر روی عنوان پیشنهادی Nishino یعنی MNGIE توافق حاصل شد.[5] آمار دقیقی از مبتلایان به این بیماری در دسترس نیست، اما در نژادهای متنوعی همچون مردم کرانه‌های مدیترانه، اروپای غربی، جاماییکا، اسپانیا، ژاپن و نیز یهودیان ایرانی و آشکنازی دیده شده است.[6] در سال ۱۹۹۸، Hirano جایگاه کروموزومی بیماری MNGIE را در منطقه کروموزومی 22q13.32-qter تعیین کرد.[7و8] در سال ۱۹۹۹، Nishino متوجه شد که در این منطقه کروموزومی ژن کد کننده آنزیم تیمیدین فسفریلاز قرار دارد.[7] جهش‌های ژن تیمیدین فسفریلاز می‌توانند هموزیگوت یا هتروزیگوت باشند. آنزیم تیمیدین فسفریلاز (EC2.4.2.4) یا TdRPase با علامت اختصاری TP به نام‌هایی هم‌چون Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD-ECGF) و Gliostatin نیز خوانده می‌شود.[9] تیمیدین فسفریلاز یک آنزیم کنترل متابولیکی و اساساً کاتابولیک منحصربه‌فرد است که تیمیدین (و داکسی‌یوریدین) را در بافر فسفات به ۲-داکسیD-ریبوز۱-α-فسفات و باز تیمین (و یوراسیل) تبدیل می‌کند. واکنش از نظر ترمودینامیکی برگشت‌پذیر است، اما مسیر کاتابولیک غالب است.[3] آنزیم TP حاوی ۴۸۲ اسیدآمینه و به‌صورت دایمر وجود دارد. دایمر تیمیدین فسفریلاز از

www.SID.ir

Archive of SID

دو زیر واحد یکسان با وزن مولکولی ۴۵kDa تشکیل شده است.[۷] ژن TP انسانی (hTP) در سیستم گوارش، پلاکت‌های خون، گلبول‌های سفید، گره‌های لنفاوی، جفت، مغز، اعصاب محیطی، طحال، مثانه، ریه و لنفوسیت‌های محیطی بیان می‌شود اما در ماهیچه، کلیه، کیسه صفرا، آئورت و بافت چربی بیان نمی‌شود.[۱۰] در اثر جهش در ژن TP متابولیسم تیمیدین و داکسی‌یوریدین تغییر یافته و به‌دلیل ناقل‌های فراوانی که در انواع سلول‌ها دارند میزان آن‌ها در کل بدن افزایش یافته و منجر به تغییر در ذخایر dNTP (داکسی‌نوکلئوزید تری‌فسفات‌های) میتوکندریایی می‌شوند.[۱۲و۱۱] به‌دنبال تغییر در این ذخایر انواع Depletion، حذف‌های چندگانه و جهش‌های نقطه‌ای در mtDNA رخ می‌دهد.[۱۶-۱۳] مشخصه‌های بالینی اصلی بیماری MNGIE عبارتند از: عدم تحرک معدی- روده‌ای، کاشکسی، افتادگی پلک‌ها (Ptosis) و فلج پیش رونده عضلات خارجی چشم (Progressive external ophthalmoplegia)، نوروپاتی محیطی، لوکوانسفالوپاتی پراکنده و شواهد آزمایشگاهی مبنی بر اختلال در عملکرد میتوکندری.[۱۹-۱۷] علی‌رغم یکسان بودن تظاهرات بالینی، سن حمله و شروع مشخصه‌های بالینی این بیماری متفاوت است. میانگین سن حمله در دهه دوم یا سوم زندگی و حدود ۱۹ سالگی است. این بیماری مزمن و پیش‌رونده در اوایل بزرگ‌سالی باعث مرگ می‌شود. بسیاری از بیماران تا سن ۳۷ سالگی فوت می‌شوند.[۵] در همه بیماران هموزیگوت مبتلا به MNGIE جهش‌های ژن TP فعالیت آن را به حد چشمگیری کاهش می‌دهد. مطمئن‌ترین راه تشخیص بیماری سنجش فعالیت آنزیم TP در گلبول‌های سفید افراد بیمار است. در افراد هتروزیگوت نیز فعالیت آنزیم به ۳۰٪ افراد سالم می‌رسد.[۷] به‌علاوه میزان داکسی‌تیمیدین (dThd) و داکسی‌یوریدین (dUrd) پلاسما و ادرار بیماران نیز می‌تواند به‌طور غیر مستقیم شاخصی برای میزان فعالیت آنزیم TP باشد. سطح تیمیدین و یوریدین پلاسما و ادرار در بیماران هموزیگوت به‌میزان چشمگیری بالاست.[۲۳-۲۰] چون تجمع سیستمیک dThd و dUrd سمی است، کاهش نوکلئوزیدهای خون به‌عنوان درمان احتمالی MNGIE پیشنهاد شده است. در ابتدا تلاش‌هایی برای حذف نوکلئوتیدهای مازاد خون از طریق همودیالیز صورت گرفت. اگرچه کاهش قابل توجه غلظت dThd در طی دیالیز و بلافاصله پس از آن حاصل می‌شود، اما چند ساعت بعد سطح نوکلئوزیدها به‌دلیل بازجذب آن‌ها به‌مقدار قبل از دیالیز بر می‌گردد.[۲۵و۲۴و۲۲] بنابراین داروهای کاهنده سرعت بازجذب کلیوی dThd و dUrd می‌توانند باعث کاهش غلظت dThd و dUrd در خون مبتلایان به MNGIE شوند.[۷] پلاکت‌ها به‌عنوان منابع سلولی غنی از TP هنگامی که به بیماران MNGIE تزریق می‌شوند فعالیت TP تا حدی برگشته و سطح dThd و dUrd خون به‌طور موقتی کاهش پیدا می‌کند. نیمه عمر کوتاه پلاکت‌های اگزوژن در خون دریافت‌کننده از پاک‌سازی مؤثرتر و پایدارتر این نوکلئوزیدها جلوگیری می‌کند.[۲۷و۲۶] تلاش‌های بعدی درمانی می‌تواند شامل جایگزینی آنزیم، پیوند سلول‌های بنیادی و ژن درمانی باشد.[۲۸و۷] اولین تلاش‌ها برای درمان از طریق پیوند سلول‌های بنیادی آلوژنیک در سال ۲۰۰۶، چشم‌اندازهای جدیدی را برای درمان MNGIE ایجاد کرد.[۳۰و۲۹و۷] در MNGIE علایم بالینی در طول زندگی بیماران پیشرفت می‌کنند، زیرا اختلال در عملکرد میتوکندری چند سال پس از تجمع اثرات عدم تعادل ذخایر نوکلئوزیدی بر mtDNA ایجاد می‌شود. این پروسه می‌تواند از طریق کاهش dThd و dUrd به حد نرمال یا نزدیک نرمال متوقف شود. اما هنوز مشخص نیست که آیا جهش‌های mtDNAی سوماتیک تجمع یافته در سلول‌های post- mitotic بیماران برگشت پذیرند یا نه؟ بنابراین درمان باید در مراحل اولیه بیماری آغاز شود تا از آسیب میتوکندریایی بیشتر جلوگیری شود و عوارض بالینی به‌شدت ناتوان‌کننده بیماری به حداقل برسند.[۷]

روش بررسی

این مطالعه از نوع علوم پایه و کاربردی بوده و در بیمارستان شریعتی تهران و در سال‌های ۸۷ و ۸۸ صورت گرفته است.

مواد شیمیایی: کلیه مواد ما از شرکت سیگمای آمریکا تهیه شدند و شامل موارد زیر بودند: Ethylene Diamine Tetra-Acetate (EDTA): هر یک میلی‌گرم از آن به‌عنوان ضد انعقاد برای هر میلی‌لیتر خون تام و با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار برای تهیه محلول کلرید آمونیوم سرد.

$KHCO_3$: با غلظت ۱۰ میلی‌مولار برای تهیه محلول کلرید آمونیوم سرد. NH_4Cl: با غلظت ۱۵۵ میلی‌مولار برای تهیه محلول کلرید آمونیوم سرد. Dithiothreitol: با غلظت یک میلی‌مولار برای تهیه محلول واکنشی. Thymidine: با غلظت دو میلی‌مولار برای تهیه محلول واکنشی و با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار به‌عنوان استاندارد خارجی در HPLC.

www.SID.ir

Archive of SID

$HClO_4$: با غلظت ۰/۵ مولار برای دپروتیینه کردن پلاسما و با غلظت هشت مولار برای توقف واکنش.

Acetic acid: محلول ۰/۲٪ آن به‌عنوان فاز متحرک در HPLC.

Acetonitrile: محلول ۷٪ آن به‌عنوان فاز متحرک در HPLC.

Na_2HPO_4: با غلظت ۹/۲ میلی‌مولار برای تهیه بافر PBS.

NaH_2PO_4: با غلظت ۱/۳ میلی‌مولار برای تهیه بافر PBS.

NaCl: با غلظت ۱۴۰ میلی‌مولار برای تهیه بافر PBS.

K_3PO_4: با غلظت ۳۵ میلی‌مولار برای تهیه محلول واکنشی و بافر لیز سلولی به‌روش سونیکاسیون. Standard Protein: با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ میکرومولار برای تهیه منحنی استاندارد در روش سنجش پروتیین برادفورد. CBB G250: ۱۰۰ میلی‌گرم آن برای تهیه یک لیتر محلول برادفورد. Ficoll-Hypaque: برای جداسازی گلبول‌های سفید. Ethanol: ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ۹۰٪ آن برای تهیه یک لیتر محلول برادفورد. H_3PO_4: ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول ۸۵٪ آن برای تهیه یک لیتر محلول برادفورد.

2-thio-6-azauridine: با غلظت ۵۰ میکرومولار به‌عنوان استاندارد داخلی در HPLC.

نمونه‌گیری: خون‌گیری از چهار بیمار (سه مرد و یک زن) مشکوک به MNGIE در بیمارستان دکتر شریعتی با محدوده سنی ۲۵ تا ۳۵ سال و ۹ فرد سالم که همگی بدون توجه به جنسیت در گروه سنی ۲۵ تا ۳۵ سال قرار داشتند (البته سن و جنسیت هیچ‌یک بر میزان فعالیت آنزیم TP تأثیر ندارند) و مبتلا به بیماری مرتبط با اختلالات مادرزادی متابولیسم نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها نبودند به‌میزان 5ml یا بیشتر انجام گرفت. از EDTA به‌عنوان ضد انعقاد استفاده شد. لوله‌های محتوی خون به فلاسک یخ منتقل و جداسازی پلاسما تا حداکثر ۳۰ دقیقه بعد انجام گرفت.[۳۰و۳۱]

جداسازی پلاسما: نمونه‌ها در ۳۵۰۰rpm و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. جدا کردن مایع رویی (پلاسما) به‌وسیله سمپلر انجام گرفته و رسوب جهت استفاده در مراحل بعدی نگهداری شد. پلاسما با اسید پرکلریک ۰/۵ مولار به نسبت یک به دو دپروتیینه شد. پلاسما پس از دپروتیینه شدن دو بار در ۱۲۵۰۰rpm و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی (پلاسمای دپروتیینه) جدا شده و در ۷۰ °C– جهت تزریق به ستون RP-HPLC نگه‌داری شد.[۳۰و۳۱]

جداسازی گلبول‌های سفید: رسوب حاصل از مرحله قبل (خون بدون پلاسما) با بافر PBS که pH آن برابر با ۷/۴ بود به نسبت یک به یک سوسپانسیون شد. دو سهم از سوسپانسیون فوق به لوله حاوی یک سهم از محلول Ficoll-Hypaque به‌صورت قطره‌قطره اضافه شد و گرادیان حاصل در ۱۰۰۰rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه و در ۴ °C سانتریفیوژ شد. بخش سفید (بافی کوت حاوی گلبول‌های سفید) بین دو لایه شفاف به‌وسیله سمپلر جدا شد. کلرید آمونیوم سرد به گلبول‌های سفید به نسبت یک به یک جهت لیز گلبول‌های قرمز احتمالی موجود در آن افزوده شد. محلول فوق در ۱۵۰۰rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴ °C سانتریفیوژ شده، مایع رویی دور ریخته شده و مرحله قبلی با سه میلی‌لیتر PBS تکرار شد. رسوب حاصل در یک میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون شد. سلول‌های موجود در رسوب سلولی منجمد حاصل از مراحل قبلی به دو روش شوک سرمایی و سونیکاسیون لیز شدند. در روش شوک سرمایی نمونه‌ها در ازت مایع به‌مدت ۳۰ ثانیه با فواصل پنج دقیقه قرار گرفتند. این عمل سه بار تکرار شد. در روش سونیکاسیون ۵۰۰ میکرولیتر محلول سرد پتاسیم فسفات با pH=۷/۴ به نمونه افزوده شده و سونیکاسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط سرمای ثابت و در آب یخ انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ سلول‌های لیز شده در ۶۰۰۰rpm، در ۴ °C و به‌مدت ۲۰ دقیقه مایع رویی به‌صورت چند Aliquot برای سنجش پروتیین به‌روش برادفورد و سنجش فعالیت آنزیم در ۷۰ °C– فریز شدند.[۳۰و۳۱]

سنجش پروتیین تام به‌روش Bradford (BF): از یک Aliquot حاصل از مرحله قبل برای تعیین غلظت پروتیین به‌روش BF استفاده شد. معرف BF و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ و ۱۰۰ میکرومولار از پروتیین استاندارد تهیه شدند. ۱۰ میکرولیتر از هر یک از استانداردها و نمونه‌های سلولی به یک میلی‌لیتر از معرف BF افزوده شده و جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر پس از دو دقیقه قرائت شد. در مرحله بعد منحنی استاندارد رسم و با استفاده از آن غلظت‌های مجهول مربوط به پروتیین تام نمونه‌های سلولی تعیین شدند.

سنجش فعالیت آنزیم TP: محلول واکنشی شامل پتاسیم فسفات، دی تیوتریتول و تیمیدین و یک Aliquot دیگر از نمونه سلولی به‌مدت پنج دقیقه در ۳۷ °C به‌طور جداگانه انکوبه شدند. واکنش با افزودن یک بخش از نمونه سلولی (۱۰۰ میکرولیتر) به ۲۰۰ میکرولیتر محلول واکنشی (حجم کلی مخلوط واکنشی: ۳۰۰ میکرولیتر) آغاز شد. بعد از زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۰۵ دقیقه، ۴۰ میکرولیتر از

www.SID.ir

Archive of SID

محیط واکنش برداشته شده و با افزودن به ۱۰ میکرولیتر $HClO_4$ هشت مولار سرد و نگهداری در یخ به‌مدت ۱۰ دقیقه واکنش کاتالیز شده به‌وسیله تیمیدین فسفریلاز متوقف شد. هر یک از این نمونه‌ها در ۶۰۰۰rpm، در دمای ۴ °C و به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاوی تیمین تولید شده و تیمیدین باقی مانده برای آنالیز HPLC فاز معکوس جمع‌آوری شد.[۳۱و۳۰]

آنالیز HPLC: [۳۱و۳۰] سیستم HPLC ما شامل یک ستون فاز معکوس (Alltima C18 rocket, 250mm×4.6 mm, 3µm particle size) و یک ستون کمکی (Alltima C18, 5µm particle size) و جستجوگر UV بود. طول موج مورد استفاده ۲۶۵nm بود. جداسازی تیمیدین از بقیه مواد به‌روش ایزوکراتیک انجام گرفت. سرعت جریان فاز متحرک ۱ml/min بود. فاز متحرک شامل اسید استیک ۰/۲٪ و استونیتریل ۷٪ بود. استاندارد خارجی مورد استفاده تیمیدین بود که در غلظت‌های مختلف ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار تهیه گردید. استاندارد داخلی مورد استفاده ۲-تیو ۶-آزایوریدین بود که در غلظت ۵۰ میکرومولار تهیه گردید. ۱۰ میکرولیتر از استاندارد داخلی به همه نمونه‌ها (از جمله استانداردهای خارجی، نمونه‌های مربوط به پلاسما و سنجش فعالیت آنزیم) و نیز ۱۰ میکرولیتر اسید پرکلریک هشت مولار نیز جهت یکسان‌سازی شرایط در همه نمونه‌ها به نمونه‌های مربوط به پلاسما و استانداردهای خارجی افزوده شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های فوق به سیستم HPLC تزریق شد. متابولیت‌ها با مقایسه Retention Time (t_R) آن‌ها با استانداردهای خالص تعیین ماهیت شدند. این زمان برای استاندارد داخلی حدوداً چهار دقیقه و برای تیمیدین ۶/۵ دقیقه تعیین گردید.

محاسبه فعالیت TP: نمودار مقدار تیمیدین مصرف شده (y) در مقابل زمان (x) رسم شد و سپس شیب نمودار (میکرومول محصول تشکیل شده در ساعت) با آنالیز رگراسیون خطی محاسبه شد. در مرحله بعدی فعالیت ویژه تیمیدین فسفریلاز (µm/mg/h) با تقسیم شیب نمودار به‌مقدار کل پروتیین (میلی‌گرم) سنجش شده در مراحل قبلی محاسبه شد.[۳۱و۳۰]

تعیین الگوی توزیع فعالیت تیمیدین فسفریلاز به‌وسیله تست‌های Kolmogorov-Smirnov و Shapiro-Wilk صورت گرفت. آنالیز اختلاف در فعالیت تیمیدین فسفریلاز بین دو گروه بیمار و سالم با Sample t-test انجام و سطح اهمیت یک قیاس در $P<0/05$ بود.

یافته‌ها

تیمیدین پلاسما: در مطالعه ما با استفاده از منحنی استاندارد میانگین تیمیدین پلاسما در افراد بیمار ۷/۹۹µmol/L اندازه‌گیری شد (SD=۵/۳۲) و حداقل میزان تیمیدین پلاسما در افراد بیمار نیز ۳/۱۷µmol/L اندازه‌گیری شد. در افراد سالم میزان تیمیدین پلاسما کمتر از حد قابل اندازه‌گیری با سیستم HPLC ما بود (یعنی کمتر از ۰/۵µmol/L) و در نتیجه مقایسه‌ای هم بین دو گروه بیمار و سالم انجام نگرفت. در شکل ۱ کروماتوگرام‌ها و نمودار استاندارد و در شکل ۲ کروماتوگرام‌های متعلق به یک فرد بیمار و یک فرد سالم آمده است.

فعالیت و فعالیت ویژه آنزیم TP: برای تعیین فعالیت آنزیم TP در افراد بیمار و سالم تغییرات تیمیدین در اثر فعالیت آنزیم در مقابل زمان رسم شد. شکل ۳ کروماتوگرام‌ها و نمودار مربوط به فعالیت آنزیمی برای یک فرد بیمار و در شکل ۴ کروماتوگرام‌ها و نمودار مربوط به فعالیت آنزیمی برای یک فرد سالم آمده است. برای محاسبه میزان تیمیدین باقی مانده بعد از هر زمان از منحنی استاندارد موجود در شکل ۱ استفاده گردید. بعد از رسم نمودار تغییرات تیمیدین در مقابل زمان برای هر یک از افراد بیمار و سالم، برای محاسبه فعالیت ویژه آنزیم TP در این افراد شیب نمودارهای فوق بر میزان پروتیین تام در هر نمونه تقسیم گردید. در جدول ۱ آنالیز آماری و مقایسه فعالیت ویژه آنزیمی در دو گروه سالم و بیمار آمده است. در مطالعه ما میانگین فعالیت ویژه TP در جمعیت کنترل ۵۲۵±۱۶۵nmol/h/mg و در افراد بیمار ۱۴±۴nmol/h/mg به‌دست آمد. میزان فعالیت ویژه آنزیم در افراد بیمار کمتر از ۵٪ افراد سالم بود.

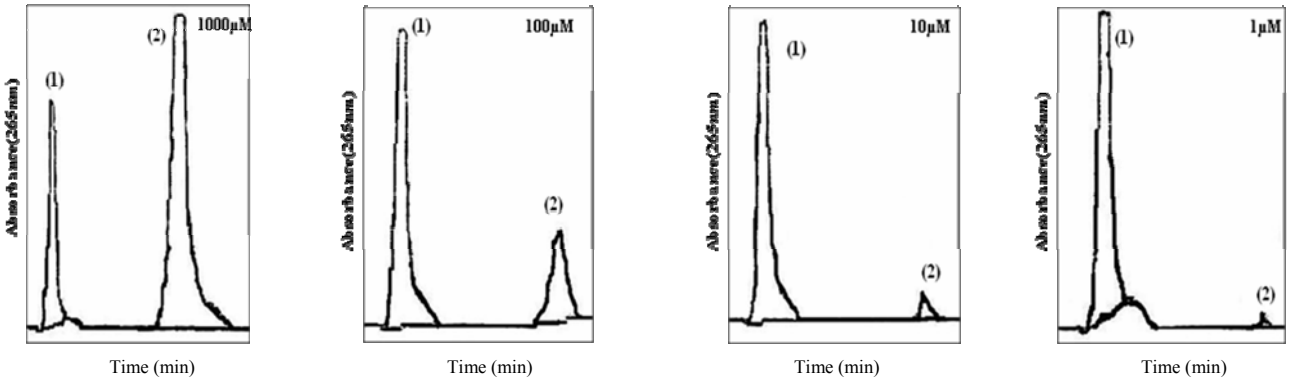
بحث

در میان گروه‌های مختلف انسفالوپاتی‌های میتوکندریایی، MNGIE یک بیماری قابل تشخیص از نظر کلینیکی است زیرا دارای تظاهرات بالینی یکسانی در افراد مختلف است. با این حال تظاهرات بالینی MNGIE در طی دوران جوانی و بزرگ‌سالی بروز یافته و پیش می‌رود و بنابراین بیماری می‌تواند در مراحل اولیه آن غیر قابل تشخیص باشد. به‌همین دلیل یک روش مستقل و قابل اعتماد برای کنترل و تشخیص قطعی بیماری فوق‌العاده مفید است. آنالیز توالی ژنی TP در

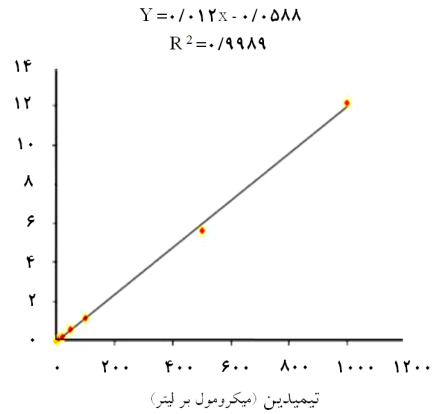
www.SID.ir

Archive of SID

A

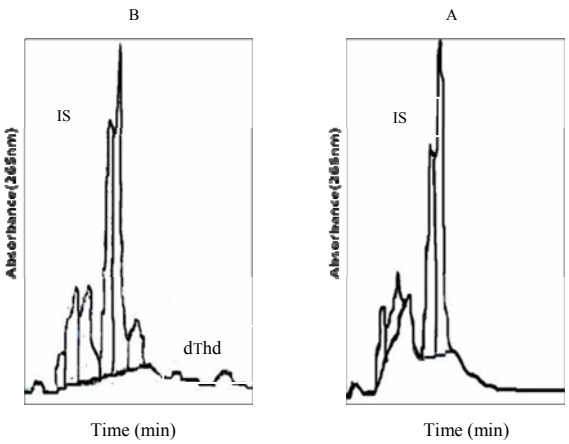


B



تیمیدین (µmol/L)	سطح زیر منحنی استاندارد داخلی (IS)	سطح زیر منحنی تیمیدین	سطح زیر منحنی Thymidine/IS
۱	۳۲۷۰۶۷	۱۵۳۱	۰/۰۰۴۶۸۰۹۹۸
۵	۳۱۳۷۰۲	۱۲۷۵۹	۰/۰۴۰۶۷۲۳۵۸
۱۰	۳۲۲۴۴۸	۳۲۷۲۴	۰/۱۰۱۴۸۶۱۳۱
۲۰	۳۲۷۵۰۰	۶۵۲۱۰	۰/۱۹۹۱۱۴۵۰۴
۵۰	۲۹۸۸۲۶	۱۷۰۰۲۳	۰/۵۶۸۹۶۹۹۰۲
۱۰۰	۳۲۰۷۵۳	۳۶۴۱۳۶	۱/۱۳۵۲۵۳۶۰۶
۵۰۰	۳۲۸۴۷۵	۱۸۵۰۶۴۵	۵/۶۳۴۰۵۱۲۹۸
۱۰۰۰	۳۱۵۱۴۵	۳۸۲۵۷۳۷	۱۲/۱۳۹۶۰۸۷۵

شکل-۱-A: کروماتوگرام‌های تیمیدین نمونه‌های استاندارد در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار. کروماتوگرام غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ (۱: پیک استاندارد داخلی ۲: پیک استاندارد خارجی). **B) منحنی استاندارد تیمیدین مورد استفاده برای تبدیل اعداد مربوط به سطح زیر منحنی در نمونه‌های مجهول به غلظت‌های میکرومولار تیمیدین**



شکل-۲-A: کروماتوگرام فرد سالم: پیک تیمیدین دیده نمی‌شود. B) کروماتوگرام فرد بیمار: دارای پیک تیمیدین در پلاسما

جدول-۱: مقایسه فعالیت ویژه آنزیمی در دو گروه بیمار و سالم

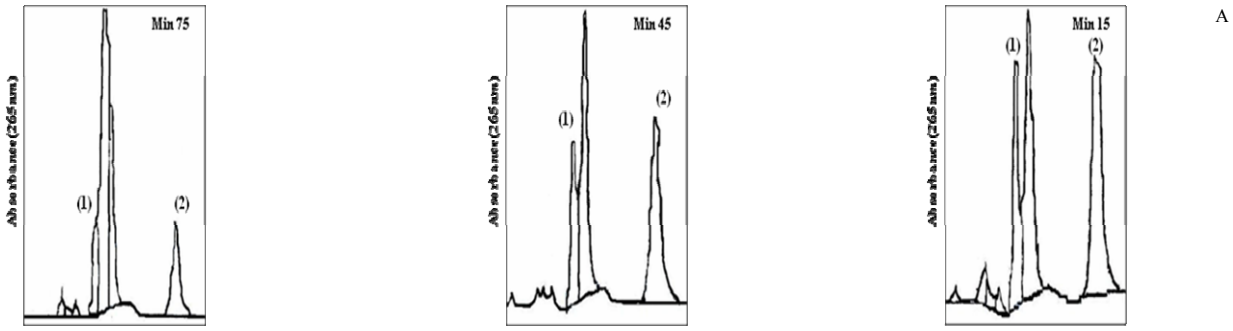
گروه	تعداد	میانگین فعالیت ویژه آنزیمی	SD	P
سالم	۹	۵۲۵	۱۶۵	<۰/۰۰۰۱
بیمار	۴	۱۴	۴	

آنالیز اختلاف در فعالیت تیمیدین فسفریلاز بین دو گروه بیمار و سالم با Sample t-test انجام شد و سطح اهمیت یک قیاس در P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

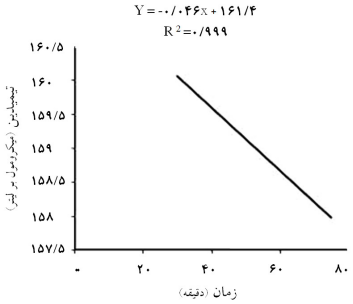
www.SID.ir

Archive of SID

A



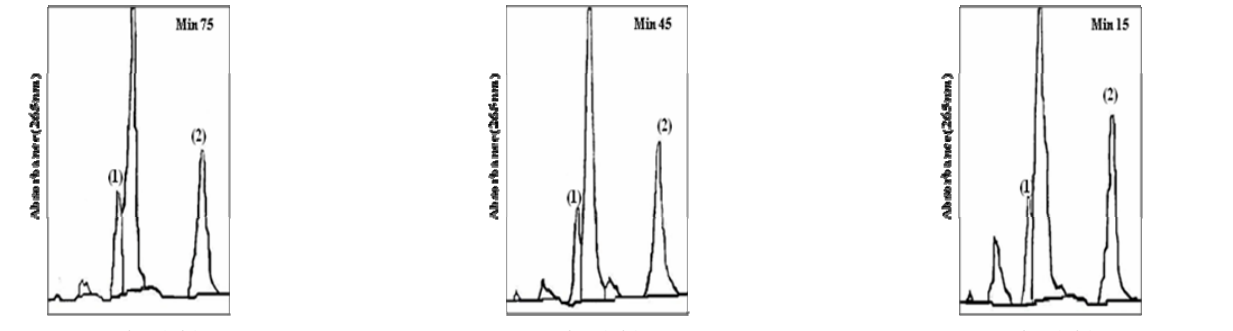
B



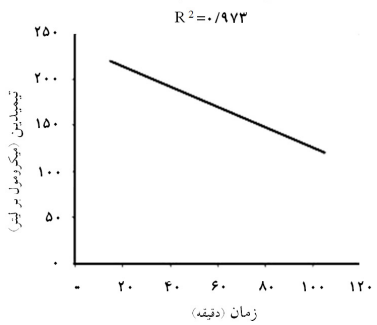
زمان (min)	سطح زیر منحنی استاندارد داخلی (IS)	سطح زیر منحنی تیمیدین	سطح زیر منحنی Thymidine/IS	غلظت تیمیدین (µmol/L)
۱۵	۱۰۹۱۵۳	۳۵۹۲۵۰	۳/۲۹۱۲۵۱۷۲۹	۲۷۴/۲۷۰۹۷۷۴
۳۰	۲۷۹۳۹۷	۶۸۶۰۸۳	۲/۴۵۵۵۸۴۷۰۶	۲۰۴/۶۳۲۰۵۸۸
۴۵	۲۸۴۱۶۷	۶۲۶۸۶۶	۲/۲۰۵۹۷۷۴۷۱	۱۸۳/۸۳۱۴۵۵۹
۶۰	۳۷۰۲۰۷	۷۶۲۸۲۱	۲/۰۶۰۵۲۵۵۹۸	۱۷۱/۷۱۰۴۶۶۵
۷۵	۴۵۷۶۹۰	۸۱۶۱۰۶	۱/۷۸۳۰۹۷۷۳	۱۴۸/۵۹۱۴۷۷۵
۹۰	۳۹۸۰۸۶	۶۹۶۴۶۷	۱/۷۴۹۵۳۹۰۴۴	۱۴۵/۷۹۴۹۲۰۴

شکل-۳-A: کروماتوگرام‌های تیمیدین باقی‌مانده بعد از ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰ دقیقه از فعالیت آنزیم در یک بیمار. کروماتوگرام دقایق ۱۵، ۴۵ و ۷۵ (۱: پیک استاندارد داخلی ۲: پیک تیمیدین باقی‌مانده). **B) نمودار فعالیت آنزیمی در بیمار با تقسیم شیب نمودار به عدد ۲۸۲/۸** (میزان پروتیین نمونه بیمار mg/L) **فعالیت ویژه آنزیمی** (µmol//mg/min) **به‌دست می‌آید.**

A



B



زمان (min)	سطح زیر منحنی استاندارد داخلی (IS)	سطح زیر منحنی تیمیدین	سطح زیر منحنی Thymidine/IS	غلظت تیمیدین (µmol/L)
۱۵	۳۵۸۹۵۹	۷۶۰۲۲۰	۲/۱۱۷۸۴۶۳۲۸	۱۷۶/۴۸۷۱۹۴
۳۰	۳۶۹۱۳۹	۷۲۰۶۱۳	۱/۹۵۲۱۴۵۳۹۸	۱۶۲/۶۷۸۷۸۳۲
۴۵	۳۹۴۲۳۹	۷۵۴۰۱۴	۱/۹۱۲۵۸۰۹۴۷	۱۵۹/۳۸۱۷۴۵۶
۶۰	۲۷۵۷۶۷	۵۲۵۰۱۷	۱/۹۰۳۸۴۲۷۳۷	۱۵۸/۶۵۳۵۶۱۴
۷۵	۳۳۶۰۹۶	۶۳۷۲۰۹	۱/۸۹۵۹۱۳۶۶۸	۱۵۷/۹۹۲۸۰۵۶
۹۰	۳۸۰۵۶۹	۶۸۹۳۷۲	۱/۸۱۱۴۲۴۴۷۲	۱۵۰/۹۵۲۰۳۹۴

شکل-۴-A: کروماتوگرام‌های تیمیدین باقی‌مانده بعد از ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵، ۹۰ دقیقه از فعالیت آنزیمی در فرد سالم. کروماتوگرام دقایق ۱۵، ۴۵ و ۷۵ (۱: پیک استاندارد داخلی ۲: پیک تیمیدین باقی‌مانده). **B) نمودار فعالیت آنزیمی در فرد سالم با تقسیم شیب نمودار به عدد ۲۱۸/۴** (میزان پروتیین نمونه فرد سالم mg/L) **فعالیت ویژه آنزیم TP** (µmol//mg/min) **به‌دست می‌آید.**

www.SID.ir

Archive of SID

بیماران مشکوک به MNGIE یک ابزار با ارزش برای تأیید و یا رد بیماری است، اما این روش محدودیت‌هایی دارد. یکی از این محدودیت‌ها این است که برای پیدا کردن تغییرات مسلم در نوکلئوتیدهای مختلف که در ژن TP بیماران MNGIE مشخص شده است، حداقل ۹ اگزون کدکننده پروتیین با مناطق اینترونی طرفین آن‌ها بایستی تعیین توالی شوند، هرچند از بررسی جهش در پروموتر یا توالی‌های اینترونی که در طرفین اگزون‌ها واقع نشده‌اند می‌تواند صرف‌نظر شود. محدودیت دیگر این است که هنگامی که یک پلی‌مورفیسم جدید مشخص می‌شود، آزمایش‌های اضافی برای تأیید آن عامل بیماری مورد نیاز است که زمان‌بر و هزینه‌برند. در نتیجه یک روش سنجش شیمیایی کاربردی قابل اعتماد برای TP سودمندتر از کنترل ژنتیکی است.[۳۲] عدم وجود مقادیر قابل اندازه‌گیری dThd و dUrd در افراد نرمال قویاً بیان‌گر این مسأله است که مقادیر داخل و خارج سلولی dThd و dUrd تا میزان زیادی به‌وسیله TP تنظیم می‌شوند. فعالیت بالای TP در پلاکت‌ها و سلول‌های خونی dThd و dUrd در گردش را تجزیه می‌کند و سطح بسیار پایینی از این نوکلئوزیدها را در داخل سلول نگه می‌دارد. به‌ویژه در بافت‌هایی مثل ماهیچه اسکلتی که TP در آن‌ها به‌مقدار بسیار ناچیزی بیان می‌شود.[۳۳] از دست رفتن کامل یا تقریباً کامل فعالیت آنزیم TP مسوول فنوتیپ بالینی این بیماری است. فعالیت TP در فیبروبلاست‌ها و همه سلول‌های خونی به‌جز گلبول‌های قرمز قابل اندازه‌گیری است و از این سلول‌ها می‌توان برای تشخیص بیماری MNGIE استفاده کرد. از آنجا که این بیماران فعالیت کامل یا تقریباً کامل TP را در گلبول‌های سفید از دست می‌دهند، بنابراین دست‌یابی به یک روش دقیق سنجش فعالیت TP دارای اهمیت کلیدی است. تا به امروز متداول‌ترین روشی که برای اندازه‌گیری فعالیت TP استفاده شده، بر مبنای اندازه‌گیری مقدار تیمین به‌روش اسپکتروفتومتری در pH قلیایی بوده است. حضور مواد مداخله‌گر در عصاره‌های خام بافتی به‌دقت کار تعیین فعالیت خدشه وارد می‌کند. در این مطالعه ما یک روش سنجش دقیق برای TP را که جداسازی تیمیدین از تیمین و دیگر متابولیت‌های مداخله‌گر را در طول ۱۷ دقیقه به‌طور کامل انجام می‌دهد، با استفاده از RP-HPLC به‌کار بردیم. به‌علاوه روش سنجش بسیار حساس و قادر به اندازه‌گیری مقادیر تا ۰/۵ میکرومول در لیتر (مقادیری تا حد پیکومول) می‌باشد. از طریق این حساسیت بالا مقدار ۵۰ میکروگرم پروتیین برای اندازه‌گیری فعالیت TP در چهار زمان مختلف کافی است، در حالی‌که در روش اسپکتروفتومتری با یک زمان ثابت ۵۰۰-۲۰۰ میکروگرم پروتیین برای اندازه‌گیری فعالیت TP لازم است. غلظت بالای پروتیین در روش اسپکتروفتومتری که برای سنجش میزان مصرف سوبسترا لازم است ممکن است باعث مشاهده سینتیک غیرخطی شود.[۳۰] برعکس روش سنجش ما نسبت به زمان و غلظت‌های پروتیین در همه شرایط تحت مطالعه خطی بود. قابل ذکر است که از دست رفتن کامل فعالیت آنزیم TP برای ایجاد بیماری MNGIE ضروری است. فعالیت TP در بیماران MNGIE به‌شدت کاهش می‌یابد؛ در حالی‌که در افراد ناقل حدود ۳۵٪ افراد نرمال (۶۰-۱۵٪) است و این افراد فاقد علایم بیماری می‌باشند. ناقلین جهش‌های هتروزیگوت بدون علایم بالینی‌اند، بنابراین تنها از دست رفتن کامل یا به‌نسبت کامل فعالیت TP اثرات قابل سنجشی را بر روی متابولیسم نوکلئوزیدها خواهد داشت، چراکه فعالیت نسبی TP در افراد ناقل برای حفظ سطوح نرمال نوکلئوزیدها در خون کافی است. برای تعیین این‌که آیا یک عضو خانواده ناقل جهش TP است یا خیر، ضروری است که مستقیماً برای جهش مورد بررسی ژنتیکی قرار بگیرد، زیرا سنجش dThd پلاسما حاوی اطلاعات مفیدی نیست و بین فعالیت TP در افراد ناقل و کنترل نیز هم‌پوشانی زیادی وجود دارد و نتایج مبهم هستند.[۳۲] ما فعالیت آنزیم TP را در افراد کنترل و بیمار به‌روش RP-HPLC تعیین کردیم. در تأیید گزارشات قبلی[۳۲و۳۴] در بررسی ما همه بیماران مبتلا به MNGIE جهش‌هایی در TP داشتند که منجر به از دست رفتن کامل یا تقریباً کامل فعالیت آنزیم TP شده بود. تا به‌حال هیچ مقدار مرجعی برای میزان فعالیت این آنزیم در جمعیت نرمال گزارش نشده است و مشخص نیست که آیا فعالیت TP به سن و جنس ارتباط دارد یا نه؟ میانگین فعالیت TP در جمعیت کنترل ما (۵۲۵±۱۶۵nmol/h/mg) نزدیک اما پایین‌تر از میانگین فعالیت TP در لوکوسیت‌های به‌دست آمده از افراد کنترل در تحقیقات Hirano در سال‌های ۲۰۰۲ (۶۶۷±۲۰۵nmol/h/mg)[۳۴] و ۲۰۰۴ (۶۳۴±۲۱۷nmol/h/mg)[۳۲] و بالاتر از میانگین فعالیت TP در تحقیقات van Kuielenburg در سال‌های ۲۰۰۵ (۳۱۶±۸۵nmol/h/mg)[۳۰] و ۲۰۰۶ (۳۴۲±۱۸۵nmol/h/mg)[۳۱] بود. نتایج ما در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم در افراد بیمار (۱۴±۴nmol/h/mg) نیز بالاتر از اعداد حاصل از تحقیق Hirano در سال ۲۰۰۲ (۲±۵nmol/h/mg) بود.[۳۴] در ایجاد این

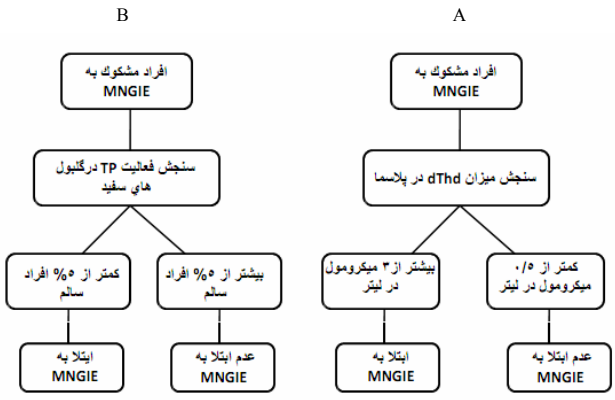
www.SID.ir

Archive of SID

تفاوت فاکتورهایی هم‌چون میزان تأخیر در سنجش فعالیت آنزیم از زمان نمونه‌گیری که این تأخیر باعث غیر فعال شدن و تجزیه بخشی از آنزیم می‌شود، میزان EDTAی استفاده شده به‌عنوان ضد انعقاد (EDTA زمان پایداری آنزیم را کاهش می‌دهد) و دما و pH که فعالیت در آن سنجش می‌شود، روش سنجش و بسیاری دیگر از فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی دیگر دخالت دارند. هر چند که مهم‌ترین دلیل اختلاف هرچند کم بین نتایج ما و Hirano در سنجش فعالیت آنزیم در بیماران می‌تواند مرتبط با شرایط هر یک از بیماران باشد. Hirano فعالیت آنزیم را به‌روش اسپکتروفتومتری و در pH=۶/۵ و دمای ۳۷ °C اندازه گرفت. در pH مذکور فعالیت آنزیم بالاتر از pH فیزیولوژیک می‌باشد. سنجش ما که با استفاده از HPLC و در pH=۷/۴ و دمای ۳۷ °C انجام گرفت دارای شرایطی مشابه به کار van Kuielenburg بود. اما به‌نظر می‌رسد با توجه به فاصله زمانی کمتر از زمان نمونه‌گیری تا سنجش فعالیت آنزیم در مطالعه ما و نیز انجام کلیه مراحل کار در شرایط ۴ °C میزان فعالیت آنزیمی در روش ما به واقعیت نزدیک‌تر باشد. اگرچه این تفاوت در مراحل سنجش نمونه‌ها توضیح قانع‌کننده‌ای را برای اختلاف در فعالیت TP در این بررسی‌ها فراهم می‌کند، اما میزان فعالیت به‌دست آمده روش سنجش را زیر سؤال نمی‌برد و مهم آن‌که در همه این تحقیقات به‌طور واضح افراد بیمار دارای فعالیت ناچیزی بودند. در مطالعه ما اختلاف فعالیت آنزیم در دو گروه بیمار و سالم کاملاً با معنی و میزان فعالیت آنزیمی در افراد بیمار کمتر از ۵٪ افراد سالم بود که این درصد نیز مشابه نتایج حاصل از تحقیقات Hirano در سال‌های ۲۰۰۲ (کمتر از پنج درصد افراد سالم)[۳۴] و ۲۰۰۴ (کمتر از هشت درصد افراد سالم) بود.[۳۲] آنالیز ما از سوبسترای TP نیز نتایج قابل قبولی را ارایه کرد. از دست رفتن فعالیت آنزیم در بیماری MNGIE باعث تغییر کلی متابولیسم نوکلئوزیدها از جمله تیمیدین می‌شود. غلظت پلاسمایی تیمیدین در بیماران MNGIE طبق گزارش‌های قبلی ۱۰۰ برابر افراد نرمال است. از آنجا که سطح فیزیولوژیکی dThd در پلاسما پایین‌تر از حد قابل اندازه‌گیری روش ما بود (~ ۰/۵ میکرومول) ما نمی‌توانیم دقیقاً مشخص کنیم که این نوکلئوزید چه مقدار از حد پایه بالاتر است. ما نتوانستیم تیمیدین را در پلاسمای افراد نرمال اندازه‌گیری کنیم و این نشان‌دهنده این مطلب است که غلظت آن کمتر از ۰/۵µM است. نتایج مربوط به‌میزان تیمیدین پلاسما در افراد بیمار در سنجش ما (۷/۹۹±۵/۳۲µmol/L) با نتایج قبلی گزارش شده توسط Hirano در سال ۲۰۰۲ (۸/۶±۵/۲µmol/L)[۳۴] و ۲۰۰۴ (۸/۶±۳/۴µmol/L)[۳۲] هم‌خوانی دارد. میزان این نوکلئوزید در پلاسمای همه بیماران مبتلا بیش از سه میکرومول در لیتر سنجش شد. روش سنجش Hirano نیز HPLC گرادیان (در مقابل روش ایزوکراتیک در مطالعه ما) بوده است. مهم‌ترین دلیل اختلافات هرچند کم بین نتایج ما و Hirano به شرایط هر یک از بیماران مربوط می‌شود. یک فاکتور شرکت‌کننده در ایجاد سطوح بالای این نوکلئوزیدها حذف ناکافی و نامناسب آن‌ها از ادرار است. dThd با همودیالیز و احتمالاً گلومرول کلیوی اولترا فیلتره می‌شود، اما به احتمال زیاد به‌وسیله توبول‌های کلیوی بازجذب می‌شود که به کلیرانس ادراری پایین نوکلئوزیدها اشاره دارد. در نهایت dThd و dUrd دوباره به خون بر می‌گردند.[۳۵]

نتایج ما نشان دادند که تعیین فعالیت TP در گلبول‌های سفید و اندازه‌گیری تیمیدین پلاسما ابزارهای تشخیصی بسیار قوی‌ای برای شناسایی بیماران MNGIE هستند. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این بررسی بر اساس سنجش dThd در پلاسما و فعالیت TP در گلبول‌های سفید، الگویی برای تشخیص بیماری MNGIE پیشنهاد می‌شود (شکل ۵).

این الگوی کنترل بیوشیمیایی برای بیماران مشکوک به MNGIE یک روش ساده و علمی را برای تأیید قطعی تشخیص در اختیار قرار می‌دهد. این دستاورد ما را از سایر روش‌های آزمایشگاهی و تعیین توالی DNA برای TP که پرهزینه است بی‌نیاز می‌کند. اما به نظر



شکل-۵: نمودار تشخیص بیوشیمیایی MNGIE. A) اندازه‌گیری dThd در پلاسما یا B) اندازه‌گیری فعالیت TP در گلبول‌های سفید، شواهد کافی برای تشخیص قطعی MNGIE فراهم می‌کنند.

www.SID.ir

Archive of SID

می‌رسد سنجش هر دو فاکتور (فعالت آنزیم و تیمیدین پلاسما) مفیدتر باشد، زیرا در فعالیت بین پنج تا ۶۰ درصد نسبت به افراد کنترل افراد سالم، ناقل و حتی بیمار نیز می‌توانند قرار بگیرند. در افراد بیمار سنجش میزان تیمیدین خون کاملا تعیین‌کننده خواهد بود. اما از آنجا که در افراد هتروزیگوت نیز مثل افراد سالم تیمیدین پلاسما قابل سنجش نیست بنابراین برای تشخیص این دو گروه از هم باید به روش‌های تعیین توالی ژن روی برد. در افراد با میزان تیمیدین بین ۰/۵ تا سه میکرومول در لیتر نیز تعیین فعالیت آنزیم می‌تواند افراد بیمار را از افراد ناقل و سالم تمیز دهد. در واقع اندازه‌گیری dThd پلاسما و فعالیت TP در گلبول‌های سفید برای تشخیص قطعی بیماری کافی است، زیرا یک تطابق کامل بین از دست رفتن فعالیت TP و افزایش غلظت داکسی نوکلئوزیدهای پلاسما وجود دارد. همه بیماران مبتلا به MNGIE در آزمایش فعالیت آنزیمی دارای فعالیت کمتر از ۵٪ بودند و بقیه دارای فعالیت بیش از ۵٪ بودند. بنابراین حساسیت و ویژگی این آزمایش بسیار بالا است. سنجش dThd نیز حساسیت و ویژگی بالایی داشت، زیرا همه بیماران و فقط بیماران dThd قابل تشخیص در پلاسما داشتند. MNGIE اولین اختلال میتوکندریایی ارثی شناخته شده مرتبط با نقص در متابولیسم سوبستراهای سنتز DNA بود. در سال‌های اخیر پیشرفت چشمگیری در شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی این بیماری به‌دست آمده است. به‌علاوه جهش در چند ژن دیگر کدکننده فاکتورهای تنظیم‌کننده نوکلئوزیدها/ نوکلئوتیدها به‌عنوان عوامل بیماری‌های میتوکندریایی گزارش شده‌اند. هموستاز نوکلئوزیدها و نوکلئوتیدها هم در خارج و هم در داخل سلول برای عملکرد میتوکندری فوق‌العاده مهم است و در آینده یک عرصه فعال و پربار در تحقیقات خواهد بود. اگر غلظت‌های بالای تیمیدین علت نقص در mtDNA باشند، کاهش و در صورت امکان حذف واقعی تیمیدین از خون یک درمان احتمالی برای بیماران MNGIE است. همودیالیز به‌نظر نمی‌رسد روش مؤثری باشد، زیرا سرعت تولید تیمیدین در بیماران MNGIE از توانایی دیالیز برای حذف این مولکول از خون بیشتر است و غلظت‌های قبل از دیالیز در کمتر از سه ساعت بعد از پایان درمان باز خواهند گشت. این امکان نیز وجود دارد که ذخایر بالای تیمیدین بدن خیلی سریع بعد از همودیالیز به داخل جریان خون رها شوند و بنابراین درمان‌های دیالیز چندگانه ممکن است نهایتاً مؤثر باشد و منجر به حذف تیمیدین تجمع یافته از خون بیماران شود.[۵] یک روش درمانی دیگر مهار بازجذب نوکلئوزید توسط کلیه و در نتیجه افزایش حذف ادراری تیمیدین است. چندین دارو وجود دارند که می‌توانند فعالیت ترانسپورترهای نوکلئوزیدی را مهار کنند. با کاهش سرعت بازجذب کلیوی تیمیدین به‌وسیله مهار کننده‌های شیمیایی ناقلین نوکلئوزید می‌توان به یک کاهش چشمگیر در غلظت تیمیدین خون بیماران دست یافت. اگر این روش مؤثر باشد احتمالاً درمان بیماران از طریق مهار اثرات برگشت‌ناپذیر سمیت تیمیدین بر روی سلول‌ها به‌زودی امکان‌پذیر خواهد شد.[۵] محققان در جستجوی روش‌های درمانی جدید دیگری برای درمان این بیماری می‌باشند که از جمله روش‌هایی که نوید آینده‌ای امیدوارکننده برای درمان این بیماری و بیماری‌های مشابه را می‌دهند عبارتند از: جایگزینی آنزیم، جایگزینی سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک Hematopoietic، ژن درمانی و غیره. شیوع این بیماری نادر اما خطرناک در گذشته کم تخمین زده می‌شد، اما شناسایی علت مولکولی آن و فهم بهتر از مشخصه‌های بیوشیمیایی آن منجر به تشخیص به‌موقع تعداد زیادی از بیماران شده است. ما معتقدیم انجام کنترل‌های بیوشیمیایی برای TP و نوکلئوزیدهای پیریمیدینی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌تواند منجر به شناسایی به‌موقع بیماران دیگر و جلوگیری از تشخیص غلط MNGIE در بیماران با اختلالات کلینیکی مشابه شود.[۳۲] *سپاسگزاری:* این طرح با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به انجام رسیده است، از آن معاونت محترم کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. Kumagai Y, Sugiura Y, Sugeno H, Takebayashi Y, Takenoshita S, Yamamoto T. Thymidine phosphorylase gene mutation is not a primary cause of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Intern Med* 2006;45(7):443-6.
2. Hirano, M., Nishino, I., Nishigaki, Y., Marti, R., et al., *Thymidine phosphorylase gene mutations cause mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE)*. Intern Med, 2006. 45(19): p. 1103.
3. Slama A, Lacroix C, Plante-Bordeneuve V, Lombès A, Conti M, Reimund JM, et al. Thymidine phosphorylase gene mutations in patients with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome. *Mol Genet Metab* 2005;84(4):326-31. Epub 2005 Jan 24.
4. Hirano M, Lagier-Tourenne C, Valentino ML, Martí R, Nishigaki Y. Thymidine phosphorylase mutations cause instability of mitochondrial DNA. *Gene* 2005;354:152-6.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Hirano M, Nishigaki Y, Martí R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): a disease of two genomes. *Neurologist* 2004;10(1):8-17.
6. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. MNGIE: from nuclear DNA to mitochondrial DNA. *Neuromuscul Disord* 2001;11(1):7-10.
7. Lara MC, Valentino ML, Torres-Torronteras J, Hirano M, Martí R. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): biochemical features and therapeutic approaches. *Biosci Rep* 2007;27(1-3):151-63.
8. Hirano M, Garcia-de-Yebenes J, Jones AC, Nishino I, DiMauro S, Carlo JR, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome maps to chromosome 22q13.32-qter. *Am J Hum Genet* 1998;63(2):526-33.
9. Taanman JW, Daras M, Albrecht J, Davie CA, Mallam EA, Muddle JR, et al. Characterization of a novel TYMP splice site mutation associated with mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Neuromuscul Disord* 2009;19(2):151-4. Epub 2008 Dec 3.
10. Nishino I, Spinazzola A, Hirano M. Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science* 1999;283(5402):689-92.
11. Pontarin G, Ferraro P, Valentino ML, Hirano M, Reichard P, Bianchi V. Mitochondrial DNA depletion and thymidine phosphate pool dynamics in a cellular model of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy. *J Biol Chem* 2006;281(32):22720-8. Epub 2006 Jun 13.
12. Marti R, Spinazzola A, Nishino I, Andreu AL, Naini A, Tadesse S, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy and thymidine metabolism: results and hypotheses. *Mitochondrion* 2002;2(1-2):143-7.
13. Bardosi A, Creutzfeldt W, DiMauro S, Felgenhauer K, Friede RL, Goebel HH, et al. Myo-, neuro-, gastrointestinal encephalopathy (MNGIE syndrome) due to partial deficiency of cytochrome-c-oxidase. A new mitochondrial multisystem disorder. *Acta Neuropathol* 1987;74(3):248-58.
14. Kocaefe YC, Erdem S, Ozgüç M, Tan E. Four novel thymidine phosphorylase gene mutations in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy syndrome (MNGIE) patients. *Eur J Hum Genet* 2003;11(1):102-4.
15. Vissing J, Ravn K, Danielsen ER, Dunø M, Wibrand F, Wevers RA, et al. Multiple mtDNA deletions with features of MNGIE. *Neurology* 2002;59(6):926-9.
16. Papadimitriou A, Comi GP, Hadjigeorgiou GM, Bordoni A, Sciacco M, Napoli L, et al. Partial depletion and multiple deletions of muscle mtDNA in familial MNGIE syndrome. *Neurology* 1998;51(4):1086-92.
17. Hirano M, Silvestri G, Blake DM, Lombes A, Minetti C, Bonilla E, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE): clinical, biochemical, and genetic features of an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Neurology* 1994;44(4):721-7.
18. Honzík T, Tesarová M, Hansíková H, Krijt J, Benes P, Zámecník J, et al. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *Cas Lek Cesk* 2006;145(8):665-70.
19. Nishino I. MNGIE (mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy). *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu* 2001;(36):160-3.
20. Fairbanks LD, Marinaki AM, Carrey EA, Hammans SR, Duley JA. Deoxyuridine accumulation in urine in thymidine phosphorylase deficiency (MNGIE). *J Inherit Metab Dis* 2002;25(7):603-4.
21. Martí R, Nishigaki Y, Hirano M. Elevated plasma deoxyuridine in patients with thymidine phosphorylase deficiency. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;303(1):14-8.
22. la Marca G, Malvagia S, Casetta B, Pasquini E, Pela I, Hirano M, et al. Pre- and post-dialysis quantitative dosage of thymidine in urine and plasma of a MNGIE patient by using HPLC-ESI-MS/MS. *J Mass Spectrom* 2006;41(5):586-92.
23. López LC, Akman HO, García-Cazorla A, Dorado B, Martí R, Nishino I, et al. Unbalanced deoxynucleotide pools cause mitochondrial DNA instability in thymidine phosphorylase-deficient mice. *Hum Mol Genet* 2009;18(4):714-22. Epub 2008 Nov 21.
24. Chinnery PF, Vissing J. Treating MNGIE: is reducing blood nucleosides the first cure for a mitochondrial disorder? *Neurology* 2006;67(8):1330-2.
25. Yavuz H, Ozel A, Christensen M, Christensen E, Schwartz M, Elmaci M, et al. Treatment of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy with dialysis. *Arch Neurol* 2007;64(3):435-8.
26. Hirano M, Martí R, Casali C, Tadesse S, Uldrick T, Fine B, et al. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2006;67(8):1458-60. Epub 2006 Sep 13.
27. Lara MC, Weiss B, Illa I, Madoz P, Massuet L, Andreu AL, et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology* 2006;67(8):1461-3. Epub 2006 Sep 13.
28. De Vocht C, Ranquin A, Willaert R, Van Ginderachter JA, Vanhaecke T, Rogiers V, et al. Assessment of stability, toxicity and immunogenicity of new polymeric nanoreactors for use in enzyme replacement therapy of MNGIE. *J Control Release* 2009;137(3):246-54. Epub 2009 Apr 14.
29. Rahman S, Hargreaves IP. Allogeneic stem cell transplantation corrects biochemical derangements in MNGIE. *Neurology* 2007;68(21):1872; author reply 1872; discussion 1872-3.
30. van Kuilenburg AB, Zoetekouw L. Determination of thymidine phosphorylase activity by a non-radiochemical assay using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;820(2):271-275.
31. van Kuilenburg AB, Zoetekouw L. Determination of thymidine phosphorylase activity in human blood cells and fibroblasts by a nonradiochemical assay using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2006;25(9-11):1261-4.
32. Martí R, Spinazzola A, Tadesse S, Nishino I, Nishigaki Y, Hirano M. Definitive diagnosis of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy by biochemical assays. *Clin Chem* 2004;50(1):120-4. Epub 2003 Nov 18.
33. Nishino, I., Spinazzola A., Papadimitriou A., Hammans S., Steiner I., et al., *Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy: an autosomal recessive disorder due to thymidine phosphorylase mutations.* Ann Neurol, 2000. 47(6): p. 792- 800.
34. Spinazzola A, Marti R, Nishino I, Andreu AL, Naini A, Tadesse S, et al. Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem* 2002;277(6):4128-33. Epub 2001 Dec 3.
35. Hirano M, Martí R, Spinazzola A, Nishino I, Nishigaki Y. Thymidine phosphorylase deficiency causes MNGIE: an autosomal recessive mitochondrial disorder. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2004;23(8-9):1217-25.

www.SID.ir

Archive of SID

Tehran University Medical Journal; Vol. 69, No. 3, June 2011: 168-178

Determining the specific activity of thymidine phosphorylase in leukocytes of patients with MNGIE and the plasma thymidine level by RP-HPLC

Shahla Rezaei MSc.[1]
Masoud Salehipour PhD.[2]
Abolfazl Golestani PhD.[1]
Safura Vardasbi Joybary MSc.[1]
Shahryar Nafisi PhD.[3]
Mahmoud Doosti PhD.[1]
Taghi Golmohammadi PhD.[1*]

1- Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, School of Science, Islamic Azad University of Parand, Parand, Tehran, Iran.
3- Department of Neurology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Dept. of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Poursina St., Ghods St., Keshavarz Blvd., Tehran, Iran.
Tel: +98-912-2974890
email: golmoham@sina.tums.ac.ir

Received: October 06, 2010 Accepted: February 24, 2011

Abstract

Background: Thymidine phosphorylase (TP) catalyses the conversion of thymidine into thymine. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE) is an autosomal recessive disease which is caused by mutations in the nuclear gene encoding TP, bringing about severe impairment of TP-enzyme specific activity and accumulation of thymidine in plasma. The clinical manifestations of MNGIE are recognizable and homogenous, but not in the early stages of the disease. In patients who are suspected of having MNGIE, determination of TP-specific activity in leukocytes and thymidine levels in plasma are diagnostic. The methods that are usually used for the measurement of TP activity and plasma thymidine are not rapid or accurate enough and lack sensitivity.

Methods: The specific activity of TP was measured by RP-HPLC in leukocytes of both the controls and the patients exhibiting clinical features suggestive of MNGIE. Moreover, plasma thymidine was assessed by the same method.

Results: The patients had detectable plasma thymidine (>3 μmol/L) but it was undetectable in the healthy controls. The patients' TP-specific activity decreased to less than 5% relative to the controls (14±4 nmol/h/mg *vs*. 525±165 nmol/h/mg, $P<0.05$). A diagnostic algorithm for the definitive diagnosis of MNGIE is suggestible based on the results of this study which relies on the measurement of plasma thymidine, TP-specific activity in leukocytes, or both.

Conclusion: In this study, we set up a sensitive and rapid assay for the evaluation of TP-specific activity by using RP-HPLC in Iran. In addition, we established reference values for TP-specific activity and plasma thymidine in the Iranian patients.

Keywords: Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy syndrome, RP-HPLC, thymidine phosphorylase.

www.SID.ir