

تشخیص غیر تجمعی بیماری فنیل کتونوری در شبکه عصبی و تاندانها از طریق طیف نوری ناهمبندی مغناطیسی هسته

فاطمه درستی^۱ (M.Sc)، زهرا زنگنه^۱ (M.Sc)، رقیه میرزازاده^۱ (Ph.D)، زهرا زمانی^۱ (Ph.D)، محمد ارجمند^۱ (Ph.D)، صدیقه صادقی^۱ (Ph.D)

۱- گروه بیوشیمی، انستیتوی باستور تهران، تهران، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایران

چکیده

هدف: بیماری فنیل کتونوری یکی از بیماری‌های متابولیک شایع است. بهان می‌شود که کشور ما نیز به دلیل اوج‌های فامیلی شیوع بالایی داشته باشد. شیوع بالایی در ایران حدود ۱:۴۰۰۰ تا ۱:۸۰۰۰ است. در هر سال گزارش‌های متعددی از عقب‌اندگی‌های ذهنی، ناتوانی‌های جسمی، اختلالات عصبی از جمله موارد بالینی این بیماری می‌شود. از جهت جلوگیری از بروز این اختلال بالینی تشخیص و وقوع این بیماری بسیار مهم است. اهمیت اصلی در این تحقیق، استفاده از شبکه عصبی ندرلایه بترون (MLP) جهت ساخت مدل ناهمبندی برای تشخیص سریع بیماری فنیل کتونوری است. هدف از این تحقیق، استفاده از شبکه عصبی ندرلایه بترون (MLP) جهت ساخت مدل ناهمبندی برای تشخیص سریع بیماری فنیل کتونوری است. روش: در این تحقیق، استفاده از داده‌های ادرار بیماران مبتلا به کمک-۱ (کمک-۱) با تکنیک نویزی (NOESY) در نگاه NMR400- تک، طیف نوری ناهمبندی اسپین-سپین هر متابولیت در طیف شانسایی گردیده. داده‌های حاصل از این طیف نوری ناهمبندی به وسیله شبکه عصبی (MLP) مدل‌سازی شده و آزمون‌های آماری در آن انجام گرفتند.

افته‌ها: طراحی شده در این تحقیق، استفاده از داده‌های حاصل از طیف نوری ناهمبندی NMR ۴۰۰- تک، به روش اسپین-سپین، هم تشخیص داده شده و آزمون‌های آماری در آن انجام گرفتند. نتیجه: نتایج حاصل از آزمون‌های آماری نشان داد که استفاده از طیف نوری ناهمبندی در تشخیص بیماری فنیل کتونوری بسیار دقیق‌تر از روش‌های معمول است. نتیجه: نتایج حاصل از آزمون‌های آماری نشان داد که استفاده از طیف نوری ناهمبندی در تشخیص بیماری فنیل کتونوری بسیار دقیق‌تر از روش‌های معمول است.

اژه‌ها: کلیدی: فنیل کتونوری، شبکه عصبی، مدل ناهمبندی مغناطیسی

مقدمه

بیماری فنیل کتونوری یکی از بیماری‌های متابولیکی شایع در جهان می‌باشد [۱] که به علت کمبود یا اختلال در عملکرد آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز در کبد، سبب بروز آسیب‌های مغزی غیر قابل برگشت در بیماران فنیل کتونوری می‌گردد [۲]. شیوع این بیماری در کشورهای مختلف از

۱:۲۵۰۰ تا ۱:۱۰۰۰۰ تولد متغییر بوده [۳،۲] و در ایران به طور میانگین میزان شیوع آن ۱:۸۰۰۰ تولد گزارش گردیده است [۲]. بیش‌ترین موارد فنیل کتونوری در ایران در کودکانی مشاهده شده است که والدین آنها ازدواج خویشاوندی داشته‌اند [۴]. در این بیماری اتوزومی مغلوب، چنانچه والدین هر دو حامل ژن بیماری باشند (در ازدواج‌های خویشاوندی

این احتمال بالاتر است) احتمال تولد نوزاد مبتلا به بیماری افزایش می‌یابد [۵]. تشخیص زودهنگام و به موقع این بیماری) قبل از دوماهگی یا حداکثر سه ماهگی (جهت جلوگیری از بروز علائم بالینی شدید و غیر قابل جبران و یا کاهش این علائم به وسیله رژیم‌های درمانی خاص بسیار حائز اهمیت است [۲].

در حال حاضر در ایران تشخیص این بیماری از طریق سنجش میزان غلظت فنیل آلانین در خون بیماران با استفاده از روش‌های گاتری و کراماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام می‌گیرد [۲]. بر اساس گزارش‌ها نتایج حاصل از روش گاتری به دلیل وجود خطاهای مثبت و منفی کاذب بالا به تنهایی قابل قبول نبوده و بایستی این نتایج با یک روش تشخیصی مکمل نیز تایید گردد که معمولاً از روش کراماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده می‌گردد [۶].

در سال‌های اخیر از روش‌های پیشرفته‌ی اسپکترومتری جرمی، کراماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی (GC-MASS)، کراماتوگرافی مایع- اسپکترومتری جرمی (HPLC-MASS) و تکنیک طیف سنجی تشدید مغناطیس هسته‌ای (NMR) جهت غربالگری بیماری‌های متابولیکی استفاده می‌گردد [۳]. از بین روش‌های معرفی شده اسپکترومتری جرمی و طیف سنجی NMR روش‌های متداول‌تری بوده و بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۷،۳]. هر چند روش طیف سنجی NMR در مقایسه با سایر روش‌های پیشرفته انتخابی نبوده و از نظر اقتصادی، مقرون به صرفه‌تر و در نتیجه سهل‌الوصول‌تر می‌باشد [۸،۹]. از اواخر سال ۱۹۸۰ میلادی با شناسایی قابلیت‌های بالای شبکه‌های عصبی مصنوعی از جمله تشخیص، شناسایی و امکان پیش‌بینی هم‌زمان بیماری‌ها و طبقه‌بندی انواع داده‌ها، کاربرد این شبکه‌ها در زمینه‌های پزشکی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است [۱۰-۱۳]. نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ جهت شناسایی انواع بیماری‌های متابولیسی انجام گرفت نشان می‌دهد که روش NMR دارای توانمندی‌ها و قابلیت‌های بالایی در زمینه شناسایی سریع و آسان

بیماری‌های متابولیسی از جمله فنیل کتونوری می‌باشد [۳]. در تحقیق پیش‌رو، برخلاف روش‌های تشخیصی مرسوم که از نمونه سرمی استفاده می‌کنند از نمونه‌های ادرار نوزادان استفاده شد و به دلیل غیر تهاجمی بودن و امکان نمونه‌گیری آسان و راحت، بیش‌تر مورد رضایت و رغبت والدین گروه هدف قرار گرفت. در این مطالعه از روش شبکه عصبی پرسپترون چند لایه (Multi-layer perceptron neural networking) (MLP) جهت مدل‌سازی و افتراق کودکان مبتلا به فنیل کتونوری از کودکان سالم و هم‌چنین تهیه یک مدل مناسب جهت پیش‌آگاهی این بیماری در افراد استفاده گردید.

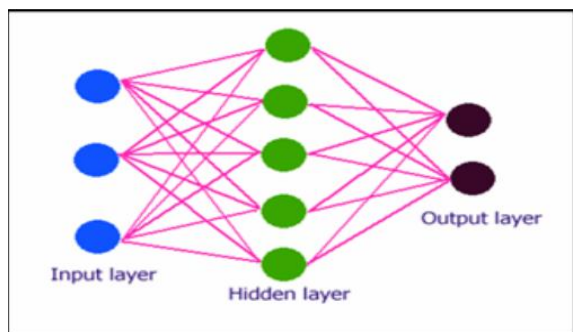
مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما و مرک تهیه گردید و آب سنگین دوتریوم (D_2O) از سازمان انرژی اتمی ایران تهیه شد.

نمونه‌های ۵۰۰۰ آزمایش نمونه‌های ادرار (سالم و بیمار) مورد مطالعه در این بررسی از کودکان رده سنی ۲-۳ ساله جمع‌آوری گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از ۵۵ کودک مبتلا به بیماری فنیل کتونوری که به کلینیک مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران در تهران مراجعه نمودند، نمونه‌های ادرار جمع‌آوری گردید. بیماری این کودکان قبلاً از طریق روش کراماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد تایید قرار گرفته بود. ۲۵ نمونه ادرار کودکان سالم از همان رده سنی و هم‌جنس و با رضایت والدین آن‌ها جمع‌آوری گردید.

محلول آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام طیف سنجی ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های ادرار را با ۱۰۰ میکرولیتر محلول یک میلی‌مولار تری‌متیل سایلایل ۲، ۳، ۴، ۳- تترا دوتروپریونیک اسید (TSP) در آب دوتره مخلوط نمودیم. محلول TSP به‌عنوان شاهد در طیف سنجی و آب سنگین دوتریوم به عنوان حلال می‌باشند. قبل از آنالیز، pH تمام نمونه‌ها، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمونه‌های ادرار به‌وسیله دستگاه اسپکترومتر رزونانس مغناطیسی هسته (NMR ۴۰۰) مگا هرتز

عادی یک شبکه عصبی مصنوعی، متشکل از لایه ورودی، لایه‌های میانی یا پنهان و لایه خروجی است (شکل ۱). لایه ورودی اطلاعات را دریافت کرده و به لایه میانی انتقال می‌دهد. لایه میانی از یک سری نرون‌های پردازشگر تشکیل شده که محل پردازش داده‌ها است و لایه خروجی شامل مقادیر پیش‌بینی شده به وسیله شبکه می‌باشد و خروجی‌های مدل را معرفی می‌نماید. تعداد لایه‌ها و نرون‌ها در هر لایه میانی به طور معمول به وسیله روش آزمون و خطا مشخص می‌گردد [۱۶]. یکی از مرسوم‌ترین انواع شبکه‌های عصبی، شبکه عصبی چندلایه پرسپترون (MLP) می‌باشد که به طور موفقیت‌آمیزی در طبقه‌بندی داده‌ها در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این شبکه‌های عصبی توانایی آموزش و یادگیری دارند. آموزش شبکه‌های عصبی در واقع تنظیم وزن‌های ارتباطی این نرون‌ها به ازاء دریافت مثال‌های مختلف می‌باشد تا خروجی‌های شبکه به سمت خروجی‌های مطلوب همگرا شود. پس از آموزش شبکه، بر روی داده‌ها تست صحت (validation) انجام می‌گیرد، یعنی قابلیت شبکه در ارائه خروجی‌های قابل قبول به ازای ورودی‌هایی که در آموزش شبکه شرکت نداشته‌اند سنجیده می‌شود. معمولاً داده‌ها را تا جایی آموزش می‌دهند که خطا بر روی داده‌ها به کم‌ترین مقدار برسد و به محض افزایش مقدار خطا، آموزش را قطع می‌کنند [۱۱].



شکل ۱. شبکه عصبی با ساختار سه لایه و ورودی ۸۰ نمونه سالم و بیمار - لایه پنهان ۱۰ نرون و خروجی بیمار و سالم

بروکر به کمک پروتکل نویزی (NOESY) طیف سنجی شدند. نمونه‌ها در دمای ۲۹۵ درجه کلوین با تعداد ۱۵۰ اسکن برای هر نمونه و با مدت زمان تاخیری ۶٫۵ ثانیه مورد طیف سنجی قرار گرفتند [۱۴]. شدت پیک موجود در جابه‌جایی شیمیایی ۳٫۱۳ (پیک مربوط به متابولیت کراتینین) به عنوان غلظت مرجع در نظر گرفته شده و غلظت متابولیت‌های دیگر بر اساس هر میلی‌مول از کراتینین بیان گردیدند.

تبدیل داده‌ها با استفاده از کد محاسباتی پروم‌تب (ProMetab V.1.1)، طیف‌های خام به دست آمده از طیف سنجی NMR به فرمت عددی مناسب، جهت آنالیزهای چندمتغیره تبدیل گردیدند [۱۵]. پروم‌تب ابزاری جهت آنالیز داده‌های حاصل از طیف سنجی NMR می‌باشد که در محیط نرم‌افزار متلب V. Matlab (۲۰۰۹) مورد استفاده قرار می‌گیرد. با استفاده از این کد محاسباتی طیف‌های NMR در جابه‌جایی‌های شیمیایی بین صفر تا ۱۰ ppm به فواصل ppm ۰/۰۰۵ تقسیم شدند. پیک رزونانس آب در محل ۷/۴ ppm حذف گردید.

آزمون آماری داده‌ها جهت بررسی و مقایسه آماری داده‌ها، از روش آنالیز اجزای اصلی (Principle component analysis) و همچنین شبکه عصبی با ساختار پرسپترون چند لایه استفاده گردید. در ابتدا داده‌های به دست آمده بر اساس متد پارتو (Pareto method) نرمالیزه شده و سپس با روش آنالیز اجزای اصلی مورد بررسی قرار گرفت. روش آنالیز اجزای اصلی جهت خوشه‌بندی داده‌ها و هم‌چنین تعیین متابولیت‌های متفاوت در دو گروه مورد استفاده قرار گرفته است. پیک‌های موجود در جابه‌جایی‌های شیمیایی بین ppm ۶-۹ که همگی ترکیبات آروماتیک می‌باشند مورد مطالعه قرار گرفتند.

شبکه عصبی مصنوعی نوعی شبکه‌های عصبی مصنوعی بر اساس ساختار و عمل‌کرد شبکه عصبی موجودات زنده طراحی شده‌اند. طرز کار این شبکه‌ها از روش کار مغز انسان الگوبرداری شده است. این شبکه‌ها از یک سری لایه تشکیل شده‌اند که شامل اجزای ساده‌ای به نام نرون است. ساختار

غلظت اسید آمینه فنیل آلانین در خون افراد مبتلا به این بیماری به عنوان بیومارکر اصلی در شناسایی افراد بیمار معرفی گردیده است [۲۰]. سنجش میزان غلظت فنیل آلانین در خون بیماران فنیلکتونوری با استفاده از روش کیت گاتری به عنوان ساده ترین روش تشخیصی می باشد [۲۲، ۲۱]. اما بر اساس گزارش ها نتایج این روش به دلیل داشتن خطاهای مثبت و منفی کاذب به تنهایی قابل قبول نمی باشد. مطالعه ای که در سال ۱۹۶۶ توسط چارلز و همکاران بر روی این بیماری انجام گرفت، نشان می دهد که نتایج حاصل از کیت گاتری دارای خطاهای مثبت و منفی کاذب بوده و نمی تواند به تنهایی قابل قبول باشند [۲۳] و بایستی نتایج آن با یک روش تشخیصی دیگری نیز تایید گردد که معمولاً روش HPLC مورد استفاده قرار می گیرد [۶]. بنابراین پروسه تشخیص این بیماری طولانی و زمان بر است.

در سال های اخیر در کشورهای پیشرفته، بررسی متابولیسم مایعات زیستی بدن با استفاده از روش های تشخیصی نوین متابولومیکس به عنوان یک ابزار تشخیصی مهم در بسیاری از بیماری ها به کار برده می شود. با شناسایی قابلیت ها و توانمندی های تکنیک طیف سنجی NMR در زمینه تشخیص و شناسایی انواع بیماری های متابولسمی، ماهیت غیر تهاجمی آن و همچنین امکان تکرار پذیری آزمایش ها و استفاده مجدد از نمونه ها، این تکنیک را به عنوان یکی از روش های نوین و پیشرفته جهت مطالعه بیماری فنیلکتونوری معرفی کرده است [۲۴-۲۶]. اما تا به حال در ایران از این روش تشخیصی جدید در زمینه شناسایی بیماری های متابولسمی استفاده نشده است. ما در این مطالعه برای نخستین بار از روش طیف سنجی NMR، جهت استخراج متابولیت های غیر نرمال موجود در نمونه های ادرار بیماران و تشخیص سریع تر و دقیق تر این بیماری استفاده نموده ایم. در این تحقیق، برخلاف روش های تشخیصی متداول از نمونه های ادرار بیماران فنیلکتونوری جهت بررسی پروفایل متابولیسمی آنها استفاده شده است. ادرار یک منبع غنی از متابولیت هاست که به عنوان نمونه زیستی بسیار متداول در

جدول ۱. مدل شبکه عصبی در تشخیص بیماری فنیلکتونوری

مدل سازی شبکه عصبی (Classifier Performance)					
نرخ خطا ^۱			۰/۰۰۰		
میزان تخمین ^۲			ماتریس در هم ریختگی ^۳		
	جامعیت ^۴	مانعیت ^۵ -۱	سالم	بیمار	جمع
سالم	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	سالم	۱۷	۰
بیمار	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰	بیمار	۰	۳۹
			جمع	۱۷	۳۹

مدل ساخته شده با ۷۰٪ نمونه کودکان سالم و بیمار

1-Error rate. 2- Values. Prediction. 3- Confusion matrix. 4- Recall. 5- Precision.

جدول ۲. تست و ارزیابی عملکرد مدل شبکه عصبی در تشخیص بیماری

فنیلکتونوری

تست شبکه (Validation Test)					
نرخ خطا ^۱			۰/۲۰۰۰		
میزان تخمین ^۲			ماتریس در هم ریختگی ^۳		
	جامعیت ^۴	مانعیت ^۵ -۱	سالم	بیمار	جمع
سالم	۰/۳۳۳	۰/۰۰۰	سالم	۶	۲
بیمار	۰/۰۰۰	۰/۲۲۲	بیمار	۰	۱۶
			جمع	۶	۱۸

آزمون اعتبار سنجی و ارزیابی مدل شبکه عصبی با ۳۰٪ نمونه کودکان

سالم و بیمار

1-Error rate. 2- Values Prediction. 3- Confusion matrix. 4- Recall. 5- Precision.

بحث و نتیجه گیری

بیماری فنیلکتونوری یکی از بیماری های ژنتیکی شایعی است که هنوز درمان کامل و قطعی برای آن یافت نشده است. اما پیشگیری و کاهش بروز علائم بالینی شدید این بیماری در صورت تشخیص به موقع امکان پذیر است [۱۷]. تشخیص سریع، به موقع و با کمترین درصد خطا در این بیماری همواره به عنوان یکی از دغدغه های پزشکان و بیماران می باشد. در سال های اخیر در کشورهای پیشرفته غربالگری نوزادان، جهت بیماری های متابولیسمی شدید به طور گسترده انجام می گیرد [۱۹، ۱۸].

در مطالعاتی که تاکنون با استفاده از روش های مختلف بر روی بیماری فنیلکتونوری انجام گرفته است، میزان افزایش

تاکنون مطالعات مشابه بسیاری همسو با تحقیق پیش رو بر روی بیماری فنیل کتونوری انجام گرفته است از جمله: در سال ۲۰۰۵ ماریاکنستانتینو (Maria A. Constantinou) و همکارانش از روش H-NMR، برای تشخیص بیماری‌های متابولیسمی در نمونه‌های ادرار استفاده کردند. طیف‌های به‌دست آمده از نمونه‌های ادرار ۴۷ کودک سالم و ۹ کودک مبتلا به فنیل کتونوری را بررسی نموده و با مقایسه آن‌ها تفاوت‌هایی را در غلظت فنیل‌آلانین و متابولیت‌های دیگر از جمله اسید آمینه‌های شاخه‌دار (والین، لوسین و ایزولوسین) به‌دست آوردند [۸] که مورد تأیید این تحقیق نیز قرار گرفت.

در سال ۲۰۰۶ ژنگ پن (Zheng Pan) و همکارانش در مطالعه‌ای با استفاده از NMR و اسپکتروسکوپی جرمی نمونه‌های ادرار بیماران متابولیسمی از جمله فنیل کتونوری را بررسی کردند. در این مطالعه اسید آمینه‌های فنیل‌آلانین، سترات، آلانین و دو ترکیب دیگر غیر نرمال در نمونه‌های ادرار بیماران فنیل کتونوری مشخص گردید [۲۹]. در جدیدترین تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ توسط سِلدا بلبیل (Selda Bülbül) انجام گرفت، از نمونه‌های ادرار ۹۸۶ نوزاد مبتلا به بیماری‌های متابولیسمی مادرزادی از جمله بیماری فنیل کتونوری طیف NMR تهیه گردید. نتایج مطالعه این محقق نشان داد که این تکنیک به عنوان یکی از روش‌های نوین و پیشرفته دارای قابلیت‌ها و توانمندی‌های بسیار بالایی در شناسایی دقیق تر و سریع تر بسیاری از بیماری‌های متابولیسمی از جمله بیماری فنیل کتونوری می‌باشد [۳].

تمایز تحقیق پیش رو با مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته، در این است که ما در این مطالعه علاوه بر استفاده از روش نوین طیف سنجی NMR جهت تشخیص بیماران فنیل کتونوری از روش هوشمند شبکه عصبی پرسپترون چند لایه (MLP) جهت مدل‌سازی نتایج حاصل از مقایسه آنالیز نمونه‌های کودکان بیمار و سالم استفاده نموده‌ایم و در نهایت یک مدل مناسب جهت پیش‌بینی این بیماری ارائه کرده‌ایم (جدول ۲). در انجام این مدل‌سازی علاوه بر بیومارکر تشخیصی فنیل کتونوری (متابولیت در جابه‌جایی‌های شیمیایی ppm

متابولومیکس در تشخیص بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود [۱۷،۹]. تغییرات غلظت متابولیت‌ها در مقایسه با پروتئین‌ها و ژنوم به آسانی آشکار شده [۲۷] و در نتیجه شناسایی متابولیت‌های غیر نرمال در نمونه‌های مورد بررسی راحت تر و سریع تر انجام می‌گیرد. با توجه به گروه هدف مورد بررسی (کودکان) به دلیل ماهیت غیرتهاجمی این روش تشخیصی، هیچ آسیبی به بیماران نمی‌رسد، در نتیجه این روش تشخیصی بیش تر مورد رضایت بیماران و والدین آن‌ها می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از تحقیق پیش رو نشان می‌دهد که غلظت اسید آمینه فنیل‌آلانین به عنوان بیومارکر تشخیصی بیماری فنیل کتونوری در طیف‌های نمونه‌های ادرار این بیماران در جابه‌جایی ۱۳/۷ ppm افزایش چشمگیری در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم دارند (شکل ۲)، علاوه بر افزایش غلظت فنیل‌آلانین متابولیت‌های غیر نرمال دیگری نیز در نمونه ادرار بیماران شناسایی شدند که با روش‌های تشخیصی متداول این بیماری شناسایی نمی‌گردند و مورد توجه قرار نمی‌گیرند. این متابولیت‌های غیر نرمال دارای ساختارهای آروماتیک می‌باشند که در طیف‌های حاصل از طیف سنجی NMR در جابه‌جایی‌های شیمیایی ۶-۹ ppm شناسایی و تشخیص داده شدند. با مقایسه آنالیز طیف‌های دو گروه سالم و بیمار با تست (PCA) این متابولیت‌های غیرنرمال جداسازی و دسته‌بندی گردیدند (شکل ۳). با بررسی‌های دقیق تر و بیش تر این متابولیت‌های غیر نرمال، امکان دستیابی به بیومارکرهای تشخیصی جدید بیماری فنیل کتونوری وجود دارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط ژیانگو (Xianguo Xia) و همکارانش صورت گرفت، نشان داده شد که روش‌های آنالیز اجزای اصلی و حداقل مربعات جزئی (به‌طور روتین در تحقیقات متابولومیکس استفاده می‌شوند) به همراه آنالیز منحنی‌های ROC (که یک روش استاندارد برای توضیح و انجام تست‌های پزشکی می‌باشد) امکان تعیین بیومارکرها را فراهم می‌آورند. هم‌چنین مشخص گردیده که روش‌های متابولومیکس به انضمام آنالیزهای چندمتغیره منجر به کشف بیومارکرهای چندگانه خواهد شد [۲۸].

- [2] Farhud D, Shalileh M. Phenylketonuria and its dietary therapy in children. 2009.
- [3] Bülbül S. Novel approach for newborn errors in metabolism screening (NEMS) by NMR: Clinical NEMS-by-NMR Study in Turkey. *Clin Biochem* 2014; 9: 700-701.
- [4] Mokhtari R, Bagga A. Consanguinity, genetic disorders and malformations in the Iranian population. *Acta Biologica Szegediensis* 2003; 47: 47-50.
- [5] Rao AN, Kavitha J, Koch M, Kumar VS. Inborn errors of metabolism: Review and data from a tertiary care center. *Indian J Clin Biochem* 2009; 24: 215-222.
- [6] Dougherty FE, Levy HL. Present newborn screening for phenylketonuria. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 1999; 5: 144-149.
- [7] Arjmand M, Kompany-Zareh M, Vasighi M, Parvizzadeh N, Zamani Z, Nazgooei F. Nuclear magnetic resonance-based screening of thalassemia and quantification of some hematological parameters using chemometric methods. *Talanta* 2010; 81: 1229-1236.
- [8] Viant MR, Rosenblum ES, Tjeerdema RS. NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environ Sci Technol* 2003; 37: 4982-4989.
- [9] Zhang A, Sun H, Wu X, Wang X. Urine metabolomics. *Clinica Chimica Acta* 2012; 414: 65-69.
- [10] Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 22: 717-727.
- [11] Brougham D, Ivanova G, Gottschalk M, Collins D, Eustace A, O'Connor R, Havel J. Artificial neural networks for classification in metabolomic studies of whole cells using 1 h nuclear magnetic resonance. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2011: 158094.
- [12] Long W. Medical diagnosis using a probabilistic causal network. *Appl Artif Int Intern J* 1989; 3: 367-383.
- [13] Long WJ. Flexible reasoning about patient management using multiple models. *Artific Int Med* 1991; 3: 3-20.
- [14] Arjmand M, Akbari Z, Taghizadeh N, Shahbazzadeh D, Zamani Z. NMR-based metabolomics survey in rats envenomed by *Hemiscorpius lepturus* venom. *Toxicon* 2015; 94: 16-22.
- [15] Viant MR. Revealing the metabolome of animal tissues using 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Methods Mol Biol* 2007; 358: 229-246.
- [16] Sadoughi F, Sheikhtaheri A. Applications of artificial intelligence in clinical decision making: Opportunities and challenges. *Director General* 2011; 8.
- [17] Raghuvveer TS, Garg U, Graf WD. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update. *Am Fam Phys* 2006; 73: 1981-1990.
- [18] Liebl B, Nennstiel-Ratzel U, Roscher A, von Kries R. Data required for the evaluation of newborn screening programmes. *Eur J pediat* 2003; 162: S57-S61.
- [19] Liebl B, Nennstiel-Ratzel U, von Kries R, Fingerhut R, Olgemöller B, Zapf A, Roscher AA. Expanded newborn screening in Bavaria: tracking to achieve requested repeat testing. *Prev Med* 2002; 34: 132-137.
- [20] Hanley WB. Phenylketonuria (PKU)-A Success Story: INTECH Open Access Publisher; 2012.
- [21] Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* 1963; 32: 338-343.
- [22] Koch J. Robert guthrie--the PKU story: a crusade against mental retardation: Hope Publishing House; 1997.
- [23] Blumenfeld CM, Wallace MJ, Anderson R. Phenylketonuria—the guthrie screening test—A method of

(۷/۳۳)، متغیرهای شناسایی شده دیگر (متابولیت‌ها در جابه‌جایی‌های شیمیایی ۹-۶ ppm) نیز در تشخیص این بیماری مورد استفاده قرار گرفته شدند. بنابراین احتمال نادیده گرفتن برخی از عوامل خطای متابولیتی به میزان بیش‌تری کاهش یافته و صحت تشخیص بیش‌تر گردید.

مدل طراحی شده در این تحقیق توانست در مرحله آموزش با موفقیت ۱۰۰٪ و بدون هیچ‌گونه خطایی، دو گروه کودکان سالم و بیمار را از هم تفکیک و دسته‌بندی نماید (جدول ۱) و در مرحله تست مدل طراحی شده، نرخ خطا تنها ۲/۰٪ بوده است (جدول ۲). بر اساس این نتایج مدل طراحی شده قادر به شناسایی و تشخیص بیماران فنیل‌کتونوری با موفقیت بالای ۹۰٪ می‌باشد. نتایج نشان می‌دهند که در مقایسه با روش‌های تشخیصی متداول مانند کیت گاتری (با خطاهای منفی و مثبت کاذب بالا) و روش HPLC (با خطای ۲/۵٪) میزان خطای روش تشخیص بیماری متابولسمی فنیل‌کتونوری به کمک طیف‌سنجی NMR و مدل شبکه عصبی تنها ۲/۰٪ می‌باشد.

با توجه به شیوع نسبتاً بالای بیماری‌های متابولسمی و افزایش رو به رشد کودکان با مشکلات جسمی و ذهنی در جامعه، نیاز به یک روش تشخیصی به موقع، سریع و در عین حال کم‌هزینه، جهت جلوگیری از شیوع این گروه از بیماری‌ها ضروری می‌باشد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، تاییدکننده توانمندی و قدرت بالای روش طیف‌سنجی NMR به همراه مدل شبکه عصبی در زمینه تشخیص و شناسایی بیماری فنیل‌کتونوری با دقت بیش‌تر و میزان خطای کم‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر را همکاران بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران بخاطر همکاری ارزشمندشان می‌نمایند.

منابع

- [1] Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* 2000; 105: 89-103.

[27] Gupta A. To err is genetics: diagnosis and management of inborn errors of metabolism (IEM). *Anthropology Today: Trends, Scopes and Applications* 2007; 415-423.

[28] Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013; 9: 280-299.

[29] Zhengzheng p, Haiwei G, Nari T, Huanwen C, Narasimhamurthy S, Bryan EH, R GC, Daniel R. Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI-MS in patients with inborn errors of metabolism. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 539-549.

quantitation, observations on reliability and suggestions for improvement. *Calif Med* 1966; 105: 429.

[24] Constantinou MA, Papakonstantinou E, Spraul M, Sevastiadou S, Costalos C, Koupparis MA, et al. ^1H NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine. *Anal Chim Acta* 2005; 542: 169-177.

[25] Ozand PT. Diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Annal Saudi Med* 1998; 18: 234-238.

[26] Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. *Clin Biochem Rev* 2008; 29: 31.

Non-invasive diagnosis of phenylketonuria by using artificial neural networking and nuclear magnetic resonance spectroscopy

Fatemeh Dorosti (M.Sc)^{1,2}, Zahra Zanganeh (M.Sc)¹, Roghayeh Mirzazadeh (Ph.D)¹, Zahra Zamani (Ph.D)¹, Mohammad Arjmand(Ph.D)^{*1} and Sedighe Sadeghi (Ph.D)¹

1 - Dept. Of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

2 - Dept of Biochemistry, Payam Noor, Tehran, Iran

(Received: 14 Sep 2015; Accepted: 30 Dec 2015)

Introduction: Phenylketonuria (PKU) is a relatively common metabolic disease in world .The high incidence of the disease in our country is due to consanguineous marriages. The prevalence of this disease in Iran is reported to be about 1: 4000 to1: 8,000 births per year. Mental retardation, physical disabilities, neurological disorders are the clinical symptoms of the disease. Early diagnosis is very important to prevent the disabling consequences of the disease. The purpose of this study was to use a multi-layer neural network perceptron (MLP) to build a model for early detection and treatment of phenylketonuria patients..

Materials and Methods: Urine samples were obtained from healthy and PKU children. nuclear magnetic resonance spectroscopy was performed in NMR 400 MHz Bruker with the help of NOESY Protocol. Then peak resonance of each metabolite was identified, and modeling was done with multi-layer neural network perceptron.

Results: The Model build in this study was able to classify the data in two groups of patient and healthy individuals successfully, with more than 90% sensitivity and 0.2% error rate with high predictive power

Conclusion: Our results showed the high power capability of this technique to diagnose the Phenylketonuria with the help of NMR spectroscopy and artificial neural network.

Keywords: Phenylketonuria, Artificial neural networking, Magnetic Resonance Spectroscopy

* Corresponding author. Tel: +98 21 66402770

Arjmand1@yahoo.com