دانشگاه پیام نور

دانشکده علوم پایه

مرکز تهران شرق

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

در رشته زیست شناسی گرایش بیوشیمی

# مطالعه ی متابونومیکس بیماری فنیل کتونوری در سرم خون نوزادان به کمک طیف سنجی NMR

آزیتا شکوری ثانی صومعه سرایی

استاد راهنما:

دکتر محمد ارجمند

استاد راهنمای همکار:

دکتر رضا حاجی حسینی

استاد مشاور:

دکتر آمنه میرزازاده

اردیبهشت ماه ۱۳۹۳

جمهوری اسلامی ایران
وزارت علوم تحقیقات و فناوری

مرکز تهران شرق

شماره: .....
تاریخ: .....
پیوست: .....

دانشگاه پیام نور
دانشگاه پیام نور استان تهران
اللهم عجل لولیک الفرج و العافیة و النصر

# صورتجلسه دفاع ازپایان نامه دوره کارشناسی ارشد

## جلسه دفاع ازپایان نامه دوره کارشناسی ارشد:خانم آزیتاشکوری ثانی صومعه سرا

## دانشجوی رشته زیست شناسی-بیوشیمی به شماره دانشجویی ۹۰۹۷۲۳۰۱۱

## تحت عنوان

*"مطالعه ی متابولومیکس بیماری pku درسرم خون نوزادان به کمک طیف سنجی NMR"*

جلسه دفاع با حضور داوران نامبرده ذیل درروز چهارشنبه مورخ۹۳/۲/۱۵ساعت۱۲-۱۱ درمحل مرکز تهران شرق برگزار شد. و پس از بررسی پایان‌نامه مذکوربا نمره به عدد.....۱۹.....
به حروف .....و بادرجه ارزشیابی.....مورد قبول واقع شد نشد☐ ☑

| ردیف | هیات داوران | نام/نام خانوادگی | مرتبه دانشگاهی | دانشگاه/ موسسه | امضا |
|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | استاد راهنما | آقای دکتر محمد ارجمند | استادیار | انستیتو پاستور | |
| ۲ | استادراهنمای همکار | آقای دکتر رضا حاجی حسینی | استاد | پیام نور | |
| ۳ | استاد مشاور | خانم دکتر رقیه میرزاده | | | |
| ۴ | استاد داور و نماینده گروه | آقای دکتر بهزاد لامع راد | استادیار | پیام نور | |

تهران ، حکیمه ( سازمان آب)،
بلوار شهید بابائیان، پانزده متری
شیرازی ، پلاک۳ ، دانشگاه پیام
نور استان تهران ، مرکز تهران شرق

تلفن : ۷۷۳۱۱۲۸۶
دورنگار: ۷۷۳۱۲۷۱۶

Tshargh.Tpnu.ac.ir
Tshargh@Tpnu.ac.ir

## گواهی اصالت، نشر و حقوق مادی و معنوی اثر

اینجانب..... دانشجوی ورودی سال ..... مقطع کارشناسی ارشد رشته .....گواهی می نمایم چنان‌چه در پایان نامه خود از فکر، ایده و نوشته دیگری بهره گرفته‌ام با نقل‌قول مستقیم یا غیرمستقیم منبع و ماخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل‌قول دیگران نباشد بر عهده خویش می‌دانم و جوابگوی آن خواهم بود. دانشجو تأیید می‌نماید که مطالب مندرج دراین پایان نامه (یا رساله) نتیجه تحقیقات خودش می باشد و در صورت استفاده از نتایج دیگران مرجع آن را ذکر نموده است.

نام و نام خانوادگی دانشجو:

تاریخ و امضاء:

اینجانب .....دانشجوی ورودی سال ..... مقطع کارشناسی ارشد رشته .....گواهی می‌نمایم چنانچه براساس مطالب پایان‌نامه خود اقدام به انتشار مقاله، کتاب، و .... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، و ... و به صورت مشترک و با ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام و نام خانوادگی دانشجو:

تاریخ و امضاء:

(کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات ، آزمایشات و نو آوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می باشد.)

تقدیم به:

تمام بیماران مبتلا به بیماری قتیل کتونوری

به امید اینکه هرچه زودتر درمان قطعی و آسان

برای ایشان یافت شود.

## تشکر و قدردانی:

**خداوند را شاکرم به خاطر هدفی که پیش رویم قرار داد و راهی که برای رسیدن به آن به من نمایاند. هر چند برای رسیدن به اهداف والا باید از راه های سخت و دشوار گذر کرد اما اراده ای که برای این گذار لازم است نیز از الطاف خدا بوده و است.**

**در پیمودن این راه تا به این منزلگه که همانا به اتمام رساندن این پایان نامه در بخش بیوشیمی انیستیتو پاستور ایران و بخش NMR دانشگاه اصفهان و ارائه ی آن محضر اهالی علم و ادب بوده است، استادانی ارجمند و بزرگوار یار و یاور من بوده و از این بابت خداوند را شاکرم و بر خود واجب می دانم از تلاشها و راهنمایی های ایشان کمال تشکر و قدردانی خود را ابراز دارم.**

**با سپاس فراوان از:**

- **استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر محمد ارجمند (استاد راهنما، بخش بیوشیمی انیستیتو پاستور)**
- **جناب آقای دکتر رضا حاجی حسینی (استاد راهنمای همکار، گروه بیوشیمی دانشگاه پیام نور تهران)**
- **سرکار خانم دکتر رقیه میرزازاده (استاد مشاور، بخش بیوشیمی انیستیتو پاستور)**
- **جناب آقای دکتر لامع راد (استاد محترم داور، گروه بیوشیمی دانشگاه پیام نور تهران)**
- **سرکار خانم دکتر صدیقه صادقی (بخش بیوشیمی انیستیتو پاستور ایران)**
- **دوستان عزیزم خانم ها اکبری و زنگنه**
- **پرسنل زحمتکش بخش بیوشیمی انیستیتو پاستور**

**و در پایان تشکر ویژه ای دارم از خانواده ام و علی الخصوص همسر عزیز و مهربانم که با حمایت ها و صبوری های خود مرا در این راه یاری نمود.**

## چکیده

**مقدمه:** بیماری فنیل کتونوری یک اختلال متابولیسمی مادرزادی است که به صورت اتوزومال مغلوب منتقل می شود. این بیماری به علت نقص آنزیمی جهت متابولیسم اسید آمینه ی فنیل آلانین ایجاد می شود و باعث تجمع مقادیر سمی از این اسید آمینه در بدن می گردد. شیوع این بیماری در ایران به علت میزان بالای ازدواج فامیلی بسیار بالاست. از آنجایی که در این بیماری، به ازای هر ماه ۴ نمره از بهره ی هوشی نوزاد کم می شود، تشخیص زود هنگام این بیماری برای جلوگیری از پیشرفت آن بسیار حائز اهمیت می باشد. روش های متداول تشخیصی کنونی بر پایه ی تست گاتری و تأیید به روش HPLC می باشد. متابولومیکس بر پایه ی NMR، برای آنالیز سریع نمونه های بیولوژیکی مناسب بوده و روش اسپکتروسکوپی $^{1}$H-NMR نسبت به روش های دیگر آنالیز ارجحیت دارد، زیرا این روش تنها نیاز به مقداراندکی نمونه (بدون نیاز به پیش تیمار) برای انجام آنالیز دارد.

**روش تحقیق:** برای انجام این تحقیق، ۱۵ نمونه سرم خون نوزاد بیمار و ۱۵ نمونه سرم خون نوزاد سالم جمع آوری شد و با استفاده از اسپکتروسکوپی H-NMR و پروتکل CPMG به تحلیل و بررسی طیف های مربوطه و متابولیت های بدست آمده با استفاده از روش های آماری چند متغیره و مدل سازی شبکه عصبی مصنوعی پرداختیم.

**هدف:** هدف از این تحقیق شناسایی پروفایل متابولیکی موجود در سرم خون کودکان مبتلا به بیماری فنیل کتونوری و مشخص نمودن بیومارکرها و تشخیص سریع، آسان و کم هزینه بیماری می باشد. بدیهی است تشخیص زود هنگام این بیماری، تأثیر زیادی در کیفیت زندگی و روند بهبود این دسته از بیماران دارد.

**نتیجه:** بررسی و تحلیل طیف های مربوطه، تفاوت مسیر های متابولیسمی و متابولیت ها را در دو گروه سالم و بیمار مشخص کرد که بیشترین تغییرات متابولیت ها در مسیرهای تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین بود. میزان حساسیت تشخیص با استفاده از شبکه عصبی مصنوعی ۷۵ درصد برای افراد نرمال و ۴۳ درصد برای افراد فنیل کتونوری بدست آمد. همچنین با استفاده از این روش میزان خطای تشخیصی ۴۰ درصد برای افراد نرمال و ۴۰ درصد برای افراد بیمار محاسبه شد. با استفاده از این اطلاعات و روش های مدل سازی شبکه عصبی، می توان در تشخیص زودهنگام بیماری فنیل کتونوری از این روش بهره گرفت.



**کلمات کلیدی:** فنیل کتونوری، متابولومیکس، اسپکتروسکوپی NMR

## فهرست مطالب:


مقدمه ..... ۱

فصل اول: کلیات و مروری بر منابع ..... ۲

۱-۱ بیماریهای متابولیسم مادرزادی (IEM) ..... ۳

۱-۲ تاریخچه فنیل کتونوری ..... ۳

۱-۳ بیماری فنیل کتونوری یا PKU ..... ۴

۱-۴ علت فنیل کتونوری ..... ۵

۱- ۵ فنیل آلانین (Phe) ..... ۶

۱-۶ فنیل آلانین هیدروکسیلاز ..... ۸

۱-۷ فنوتیپ های کلینیکی فنیل کتونوری ..... ۱۰

۱-۷-۱ شکل کلاسیک فنیل کتونوری (Phe >۱۲۰۰µmol/L) ..... ۱۰

۱-۷-۲ شکل خفیف فنیل کتونوری یا mild PKU (Phe=۶۰۰-۱۲۰۰ µmol/L) ..... ۱۱

۱-۷-۳ هایپر فنیل آلانینمی خفیف و بدون PKU (Phe= ۲۴۰-۶۰۰ µmol/L) ..... ۱۱

۱-۷-۴ فنیل کتونوری بدخیم ($BH_4$ deficient) ..... ۱۱

۱-۸ فنیل کتونوری مادری یا MPKU ..... ۱۳

۱-۹ شیوه ی انتقال ..... ۱۳

۱-۱۰ علائم کلینیکی فنیل کتونوری ..... ۱۴

۱-۱۱ بیماری زایی و عقب ماندگی ذهنی در فنیل کتونوری ..... ۱۵

۱-۱۲ میزان بروز ..... ۱۶

۱-۱۳ فنیل کتونوری در ایران ..... ۱۷

۱-۱۴ اهمیت آشکارسازی و تعیین غلظت اولیه ی فنیل آلانین ..... ۱۸

۱-۱۵ تشخیص ..... ۱۹

۱-۱۵-۱ تست ادرار ..... ۱۹

۱-۱۵-۲ تست غربالگری گاتری ..... ۲۰

۱-۱۵-۳ کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی (LC-MS, or HPLC-MS) ..... ۲۰

۱-۱۵-۴ کروماتوگرافی گاز- اسپکترومتری جرمی (GC-MS) ..... ۲۰

۱-۱۶ مشکلات تشخیصی ..... ۲۱

۱-۱۷ درمان فنیل کتونوری ..... ۲۲
۱-۱۷-۱ رژیم درمانی فنیل آلانین محدود ..... ۲۳
۱-۱۷-۱-۱ عوارض رژیم درمانی با فنیل آلانین محدود ..... ۲۵
۱-۱۷-۲ درمان دارویی ..... ۲۶
۱-۱۷-۲-۱ تتراهیدروبیوپترین ..... ۲۶
۱-۱۷-۳ آمینو اسیدهای خنثی بزرگ (LNAA) ..... ۲۷
۱-۱۷-۴ درمان از طریق جانشینی آنزیم ..... ۲۷
۱-۱۷-۴-۱ فنیل آلانین آمینولیاز (PAL) ..... ۲۷
۱-۱۷-۵ ژن درمانی ..... ۲۸
۱-۱۷-۶ بازسازی سلولهای کبدی ..... ۲۸
۱-۱۸ متابولومیکس ..... ۲۸
۱-۱۸-۱ هدف از متابولومیکس ..... ۳۰
۱-۱۸-۲ تکنولوژی متابولومیکس به پیشرفت موارد زیر کمک شایانی کرده است ..... ۳۱
۱-۱۹ متابونومیکس ..... ۳۱
۱-۲۰ طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) ..... ۳۲
۱-۲۰-۱ اجزاء تشکیل دهنده دستگاه NMR ..... ۳۴
۱-۲۰-۲ کاربردهای طیف سنجی رزونانس مغناطیس هسته ..... ۳۷
۱-۲۰-۳ فواید روش رزونانس مغناطیس هسته برای اندازه گیری میزان متابولیت ها ..... ۳۷
۱-۲۰-۴ انواع روشهای طیف سنجی NMR در متابولومیکس ..... ۳۷
۱-۲۰-۴-۱ پروتکل CPMG ..... ۳۸
۱-۲۰-۴-۱-۱ کاربرد CPMG در متابولومیکس ..... ۳۹
۱-۲۱ کمومتریکس ..... ۳۹
۱-۲۱-۱ حداقل مربعات جزئی (PLS) ..... ۴۰
۱-۲۱-۲ شبکه های عصبی مصنوعی ..... ۴۱
۱-۲۲ اهداف ..... ۴۳
۱-۲۳ مروری بر متون ..... ۴۴
فصل دوم ..... ۵۲
۲-۱ مقدمه ..... ۵۳

۲-۲ روش جمع آوری نمونه ها ..... ۵۳
۲-۳ مواد و وسایل مورد استفاده جهت آماده سازی نمونه ها ..... ۵۴
۲-۴ مراحل آماده سازی نمونه ها جهت طیف سنجی NMR ..... ۵۴
۲-۵ مراحل انجام طیف سنجی NMR ..... ۵۵
۲-۶ آنالیزداده ها ..... ۵۶
۲-۷ کد محاسباتیProMetab و آنالیز طیف‌های NMR ..... ۵۷
۲-۸ بانک اطلاعاتی HMDB (Human Metabolom Data Base) ..... ۵۸
فصل سوم: یافته های تحقیق ..... ۶۰
۳-۱ نمونه طیف خام NMR بیمار و سالم ..... ۶۱
۳-۲ نتایج آنالیز طیف ها ..... ۶۲
۳-۳ داده های به دست آمده از HMDB ..... ۶۷
۳-۴ مسیرهای تغییر یافته و متابولیت های تغییر یافته در آنها ..... ۷۲
۳-۵ نتایج به دست آمده از مدل سازی شبکه عصبی ..... ۸۳
فصل چهارم: جمع بندی و پیشنهادات ..... ۸۸
۴-۱ مقدمه ..... ۸۹
۴-۲ متابولیسم و بیوسنتز تریپتوفان ..... ۹۰
۴-۳ متابولیسم و بیوسنتز فنیل آلانین ..... ۹۴
۴-۴ متابولیسم و بیوسنتز تیروزین ..... ۹۵
۴-۵ نتیجه گیری ..... ۹۸
۴-۶ پیشنهادات ..... ۹۹
منابع ..... ۱۰۰

فهرست اشکال

شکل (۱-۱) فنیل کتونوری (PKU) ..... ۴
شکل (۱-۲) متابولیسم نرمال فنیل آلانین ..... ۶
شکل (۱-۳) تبدیل اسید آمینه فنیل آلانین به فنیل کتون ها ..... ۶
شکل (۱-۴) واکنش تبدیل فنیل آلانین به تیروزین در حضور آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز و کوفاکتورش ..... ۷

شکل (۱-۵) ساختار فنیل آلانین هیدروکسیلاز ..... ۹
شکل (۱-۶) مسیر سنتز تتراهیدروبیوپترین ($BH_4$) ..... ۱۲
شکل (۱-۷) بیوسنتز مجدد تتراهیدروبیوپترین ..... ۱۲
شکل (۱-۸) نحوه به ارث رسیدن بیماری فنیل کتونوری ..... ۱۴
شکل (۱-۹) جهت یابی های هسته در مجاورت میدان مغناطیسی ..... ۳۳
شکل (۱-۱۰) شکل شماتیک از اجزاء تشکیل دهنده دستگاه NMR ..... ۳۴
شکل (۱-۱۱) ظرف نگهداری نمونه در دستگاه NMR ..... ۳۶
شکل (۱-۱۲) دستگاه اسپکتروسکوپی NMR به همراه پروب و لوله ی نمونه ..... ۳۶
شکل (۱-۱۳) نمای شماتیک عملکرد دستگاه NMR ..... ۳۷
شکل (۱-۱۴) طرح کلی اجزاء شبکه های عصبی ..... ۴۲
شکل (۱-۱۵) مدلی از یک نرون عصبی مصنوعی ..... ۴۳
شکل (۲-۱) دستگاه NMR دانشگاه اصفهان ..... ۵۵
شکل (۲-۲) پنجره نرم افزار متلب ..... ۵۷
شکل (۲-۳) تصویری که پس از نرمال سازی داده ها در محیط متلب به دست می آید ..... ۵۸
شکل (۳-۱) طیف حاصل از اسپکتروسکوپی NMR نمونه سرم خون نرمال ..... ۶۱
شکل (۳-۲) طیف حاصل از اسپکتروسکوپی NMR نمونه سرم خون بیمار ..... ۶۲
شکل (۳-۳) متابولیتهای نرمالیزه شده قبل و بعد از نرمالیزاسیون ..... ۶۳
شکل (۳-۴) اسکور پلات به دست آمده از آنالیز PLS-DA ..... ۶۴
شکل (۳-۵) پلات لودینگ به دست آمده از آنالیز PLS-DA ..... ۶۵
شکل (۳-۶) جداسازی متابولیت ها ..... ۶۶
شکل (۳-۷) آزمون صحت و دقت نمونه ها ..... ۶۶
شکل (۳-۸) نتایج حاصل از آزمون جایگشت جهت اعتبارسنجی مدل ..... ۶۷
شکل (۳-۹) پنجره Human Metabolome Data Base ..... ۶۸
شکل (۳-۱۰) پنجره سایت MetaboAnalyst برای یافتن مسیرهای متابولیسمی براساس متابولیت های مربوطه ..... ۷۱
شکل (۳-۱۱) مسیرهای متابولیکی تغییر یافته به صورت شماتیک ..... ۷۳
شکل (۳-۱۲) متابولیسم تریپتوفان ..... ۷۴
شکل (۳-۱۳) متابولیسم فنیل آلانین ..... ۷۵

شکل (۳-۱۴) متابولیسم تیروزین ..... ۷۶
شکل (۳-۱۵) بیوسنتز فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان ..... ۷۷
شکل (۳-۱۶) متابولیسم نیتروژن ..... ۷۸
شکل (۳-۱۷) متابولیسم هیستیدین ..... ۷۹
شکل (۳-۱۸) متابولیسم هورمون های استروئیدی ..... ۸۰
شکل (۳-۱۹) متابولیسم لینولئیک اسید ..... ۸۱
شکل (۳-۲۰) متابولیسم رتینول ..... ۸۲
شکل (۳-۲۱) بیوسنتز آمینوآسیل tRNA ..... ۸۳
شکل (۴-۱) متابولیسم تریپتوفان ..... ۹۲
شکل (۴-۲) متابولیسم فنیل آلانین ..... ۹۴
شکل (۴-۳) متابولیسم تیروزین ..... ۹۶

**فهرست جداول**

جدول (۳-۱) متابولیتهایی تغییر یافته که در سایت HMDB یافت شدند ..... ۶۸
جدول (۳-۲) مسیرهای متابولیکی تغییر یافته در نمونه های سرم خون بیماران PKU ..... ۷۲
جدول (۳-۳) پارامترهای مدل طراحی شده ..... ۸۴
جدول (۳-۴) نتایج اولیه حاصل از مدل سازی ۵۰٪ از نمونه ها ..... ۸۵
جدول (۳-۵) تست مدل طراحی شده ..... ۸۶
جدول (۳-۶) نتایج به دست آمده از ۱۵ نمونه ی تست شده ..... ۸۶
جدول (۴-۱) چرخه های متابولیسمی و متابولیت های تغییریافته در آنها در بیماران فنیل کتونوری ..... ۹۰

**مقدمه:**

فنیل کتونوری شایع ترین فرم یک بیماری به نام هیپرفنیل آلانینمیاست که به علت کمبود یا عدم فعالیت آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز کبد، اسید آمینه ضروری فنیل آلانین به تیروزین تبدیل نشده و سبب افزایش مزمن فنیل آلانین خون و پیدایش عوارضی از جمله آسیب مغزی غیر قابل برگشت می شود. این بیماری در بدو تولد هیچ نشانه ای ندارد و نوزاد در **۲** تا **۳** ماه اول زندگی، ظاهر کاملاً سالمی دارد ولی به تدریج علائمی هم چون بی میلی خوردن شیر، استفراغ بعد از خوردن شیر، بروز اگزما و جوش در سطح بدن، بور شدن موهای سر بدون سابقه ی ارثی ظاهر می شود. تظاهرات بالینی بیمار تا **۶-۵** ماهگی بسیار گمراه کننده است. متأسفانه تشخیص اغلب زمانی اتفاق می افتد که بیماری منجر به عقب ماندگی ذهنی کودک شده و ضایعه مغزی به وجود آمده درمان ناپذیر شده است. بنابراین باید سریع تشخیص داده شود. تأخیر در تشخیص بیماری از هفته ی سوم به بعد خطرناک است و ممکن است صدمات مغزی به معلولیت دائم منتهی شود. در سال های اخیر تعداد نوزادانی که به این بیماری مبتلا می شوند در ایران افزایش یافته و روند نوزادان مبتلا به این بیماری سیر صعودی دارد. سالانه **۳۰۰** الی **۴۰۰** نوزاد مبتلا به بیماری فنیل کتونوری در ایران متولد می شود و آمار افراد با عقب ماندگی های جسمی و ذهنی بالاتر می رود که در دراز مدت مشکلات فراوانی را برای جامعه به وجود می آورند. تا سال **۱۹۸۵**، تمام روش های مورد استفاده برای تشخیص بیماریهای مادرزادی، به صورت تک تک انجام شده ولی درسال **۱۹۸۵**، برخلاف روش های دیگر از $^{1}$H-NMR برای تشخیص اختلالات مادرزادی استفاده کردند. در این روش می توان گروه های شیمیایی متفاوت متابولیت ها را به طور همزمان شناسایی کرد، نیاز به استخراج آنها نیست، نسبت به روش های دیگر مقرون به صرفه بوده و زیان آور هم نمی باشد. در این تحقیق ما با استفاده از اسپکتروسکوپی $^{1}$H-NMR، نمونه های سرم خون نوزادان مبتلا به فنیل کتونوری را بررسی کردیم و طیف های بدست آمده از نمونه های بیماران را با نمونه های نوزادان سالم مقایسه نمودیم و تفاوت های موجود را بررسی و مارکرهای مشخصه بیماری را بدست آوردیم.

# فصل اول: کلیات و مروری بر منابع

## ۱-۱ بیماریهای متابولیسم مادرزادی[1](IEM):

بیماری های متابولیک مادرزادی یک گروه کمیاب از بیماری های ژنتیکی هستند که به وسیله فقدان یک آنزیم عملکردی، انتقال دهنده های بین غشا یا پروتئین مشابه که نتیجه آنها در مسدود کردن مسیرهای متابولیکی یکسان است، ایجاد می شوند. ژن هایی که باعث بروز این اختلالات می شوند، به صورت اتوزومی مغلوب یا وابسته به کروموزوم X هستند (اسکالز[2]، ۲۰۰۳). این اختلالات می توانند پیامدهای بالینی جدی برای نوزادان یا کودکان جوان تولید کنند و اگر تشخیص داده نشده ودرمان نشوند، می توانند سبب عقب ماندگی ذهنی برگشت ناپذر (اعم از خفیف تا شدید)، ناتوانیهای فیزیکی، آسیب های عصبی و حتی مرگ و میر شوند. تشخیص سریع (بزودی پس از تولد) و دقیق برای رسیدن به نتیجه سریع و مطلوب مهم است (مک[3]، ۲۰۱۳). اختلالات متابولیک مادرزادی هر کدام به تنهایی بیماری های نادری هستند اما در مجموع نسبتا شایع بوده و از هر ۵۰۰ تولد زنده ۱ نفر را مبتلا می کنند.

برخی از اختلالات مادرزادی عبارتند از: تورم مادرزادی آدرنال[4] (CAH)، سیستیک فیبروسیس[5](CF)، ادرار شربت افرا[6] (MSUD)، فنیل کتونوری[7] (PKU)، گالاکتوزمیا، کم کاری مادرزادی تیروئید و.....

این اختلالات می توانند بوسیله ی متابولیت های غیرطبیعی یا غلظت غیرطبیعی متابولیت های طبیعی در مایعات بدن (پلاسما، ادرار، خون) تشخیص داده شوند (انجلکی[8]، ۲۰۰۴).

## ۱-۲ تاریخچه فنیل کتونوری:

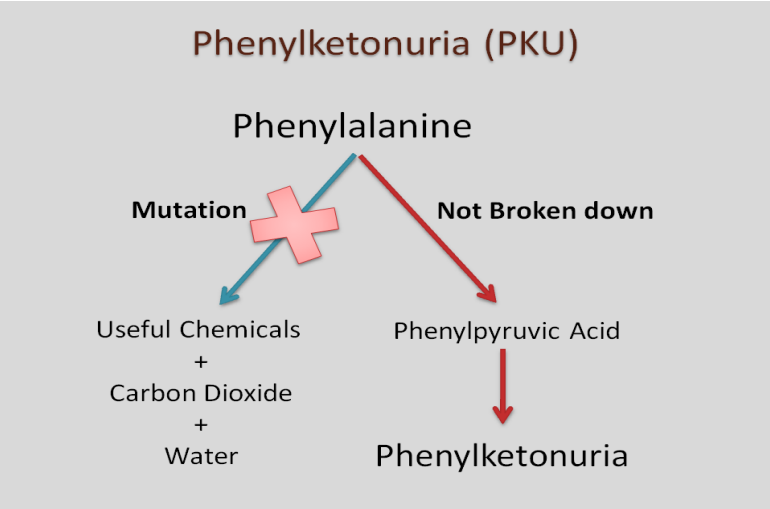
اولین بار در سال ۱۹۳۴ آسبورن فولینگ[9]، فنیل پیرویک اسید را در ادرار فرزندان دچار عقب ماندگی ذهنی یک خانواده شناسایی و آن را IP[10]نامید. یک سال بعد لیونل پنروس[11] این وضعیت را فنیل کتونوری (PKU) نام گذاری کرد. اوایل سال ۱۹۶۰، گاتری روش سنجش ممانعت باکتریایی[12]را به

[1]Inborn error of metabolism(IEm)
[2]Schulze, A.
[3]Mak, C. M
[4]Congenital Adernal Hyperplasia
[5]Cystic Fibrosis
[6]Maple Syrup Urine Disease
[7]PhenylKetonUria
[8]Engelke, U. F.
[9]Asbjorn folling
[10]imbecilitas phenylpyrouvica
[11]Linoel penrose
[12]bacterial inhibition assay

منظور اندازه گیری سطوح خونی فنیل آلانین معرفی کرد که تست گاتری نامیده شد.اواسط ۱۹۶۰ فرمولای کم فنیل آلانین، به صورت تجاری عرضه شد. اواخر ۱۹۸۰ مشخص گردید ژن مسئول کمبود آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز روی کروموزوم ۱۲q۲۳.۲ قرار دارد و در ۱۹۹۰ میزان فنیل آلانین (۶۰–۳۶۰ µmol/l) ۱ تا ۶ میلی گرم در دسی لیتر به عنوان محدوده استاندارد برای مراقبت از مبتلایان فنیل کتونوری در نظر گرفته شد (داریوش فرهود ۸۷، هانلی[1] ۲۰۱۲).

## ۱–۳ بیماری فنیل کتونوری یا PKU:

فنیل کتونوری یکی از شایع ترین اختلالات متابولیکی اسیدهای آمینه و یک بیماری اتوزومی مغلوب می باشد. این بیماری به سبب نقص در آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز که مسئول تبدیل فنیل آلانین به تیروزین است به وجود می آید. اغلب بیماران مبتلا به فنیل کتونوری (۹۸٪) از همین اختلال رنج می برند و یا به دلیل نقص در دی هیدروبیوپترین ردوکتاز که میزان بروزآن کم است (۲٪) به وجود می آیند.




شکل ۱–۱ فنیل کتونوری (PKU)

فنیل کتونوری یا PKU یک بیماری ژنتیک با الگوی اتوزومال مغلوب است که از هر دو والد یعنی پدر و مادر منتقل می شود. چون در ادرار مبتلایان به این بیماری موادی به نام فنیل کتون دفع می شود به همین جهت بیماری را فنیل کتونوری نامیده اند. فنیل آلانین یکی از اسید آمینه های ضروری است. پس از مصرف از طریق غذای روزانه مقداری از آن نیاز آنابولیک بدن را تامین نموده و مابقی توسط آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز تبدیل به تیروزین می شود. کمبود آنزیم فنیل آلانین

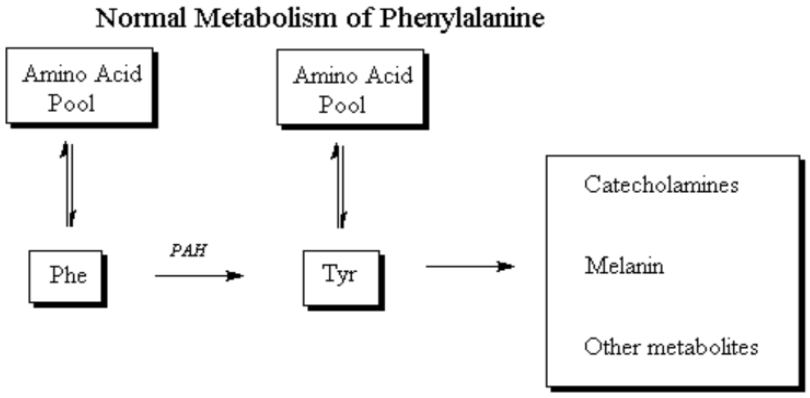
[1]William B. Hanley

هیدروکسیلاز یا کوفاکتور آن باعث تجمع اسید آمینه در بدن می گردد. تجمع فنیل آلانین بر روی سلول های مغز تاثیر می گذارد و باعث عقب ماندگی ذهنی نوزاد می شود و بیماری PKU را سبب می گردد که اگر زود تشخیص داده شود، می تواند به حالت اول برگردد و اثر منحصر به فرد آن کاهش توانایی کودک در متابولیسم فنیل آلانین است که اگر زود تشخیص داده نشود بیماری تشدید شده و اختلالات ایجاد شده به صورت برگشت ناپذیری افزایش پیدا خواهد کرد و علائم زیادی را در فرد ایجاد می کند (دستورالعمل وزارت بهداشت، ۱۳۸۹).

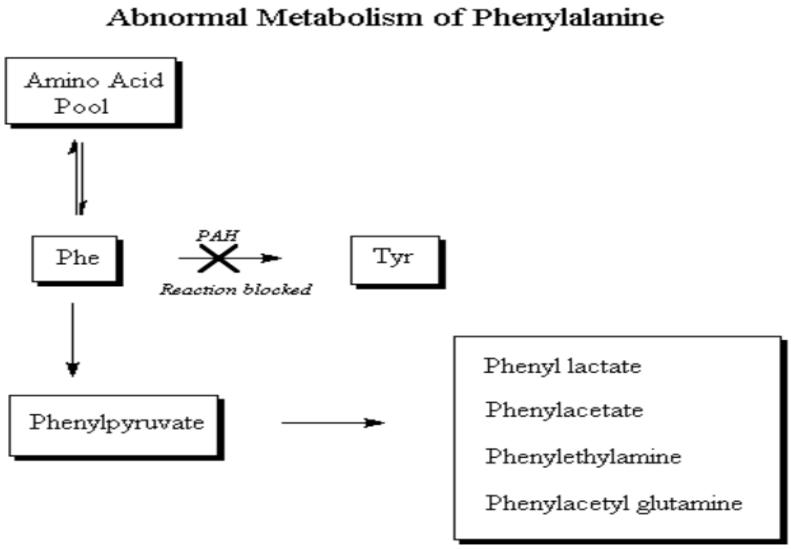
## ۱-۴ علت فنیل کتونوری:

فنیل آلانین که به اختصار Phe نامیده می شود، یک اسید آمینه است و قسمتی از تمام غذاهای پروتئینی را تشکیل می دهد. در اشخاص طبیعی و نیز بیماران مبتلا به فنیل کتونوری، مواد پروتئینی که شامل فنیل آلانین نیز هست، پس از مصرف و جذب به جریان خون وارد می شود. در افراد طبیعی، سطح فنیل آلانین خون همیشه نسبتاً پایین است (بین ۱ تا ۲ میلی گرم در دسی لیتر). فنیل آلانین جذب شده از مواد غذایی دائماً در بدن در حال تبدیل به ترکیبات دیگر است. این تبدیل در اثر ماده ای شیمیایی به نام آنزیم صورت می گیرد. در بیماران مبتلا به فنیل کتونوری، آنزیم کبدی فنیل آلانین هیدروکسیلاز[1] (PAH) وجود ندارد یا کم است و نمی تواند کار اصلی خود را به خوبی انجام دهد و در اثر این نقص، فنیل آلانین به جای تبدیل به ماده ای به نام تیروزین به مواد دیگر که سمی هستند، تبدیل می شود (شکل ۱-۲ و ۱-۳). این مواد سمی در خون بالا می روند و روی مغز در حال رشد و نمو کودک اثر می گذارند و باعث از بین رفتن کارآیی معمول مغز و اعصاب می شوند (سارتیس[2] ۲۰۰۰، ویلیامز[3] ۲۰۰۸).

[1] phenylalanine hydroxylase
[2] Surtees R
[3] Williams, R. A.




شکل ۱-۲ متابولیسم نرمال فنیل آلانین



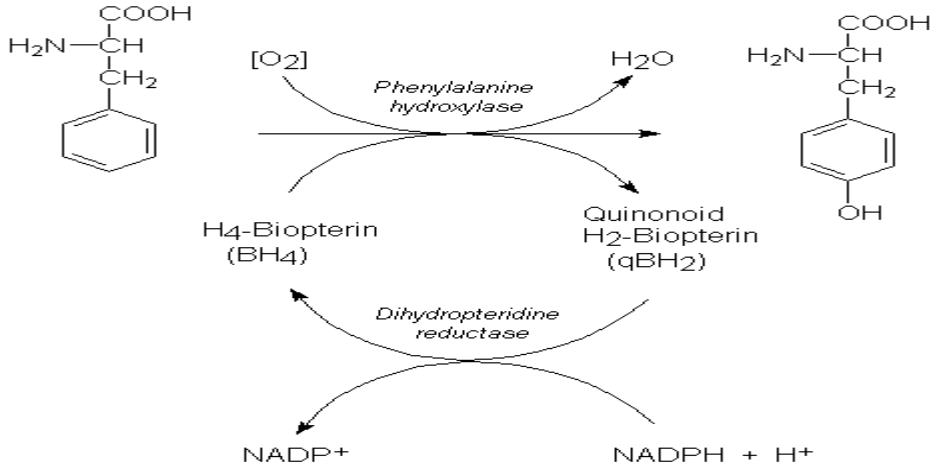

شکل ۱-۳ تبدیل اسید آمینه فنیل آلانین به فنیل کتون ها

## ۱- ۵ فنیل آلانین (Phe):

فنیل‌آلانین یکی از بیست اسید آمینه‌ی اصلی یاخته‌های زنده است و جزء اسیدهای آمینه ی ضروری و آروماتیک می باشد. آنها دسته ای از اسیدهای آمینه هستند که بدن انسان یا قادر به ساختن آنها نیست و یا نمی تواند آنها را به میزان لازم برای تأمین نیازهای خود بسازد. فنیل آلانین به صورت آناتومرهای D و L وجود دارد و ال- فنیل آلانین یک اسید آمینه ضروری است که برای سنتز پروتئین ها، کاتکول آمین ها و ملانین مورد نیاز بوده و پیش ساز اسید آمینه ال- تیروزین می باشد. نیاز روزانه بالغین به مجموع تیروزین و فنیل آلانین ۳۹ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز است که

در صورت دریافت پروتئین کافی تامین می شود. کمبود طولانی مدت فنیل آلانین سبب نقص رشد، از دست رفتن توده ی عضلانی و تخریب ارگان ها خواهد شد. منابع غذایی فنیل آلانین شامل سویا، تخم مرغ، برنج، شیرگاو، گندم، ذرت، گوشت خوک، گوشت گاو و جوجه است. به طور کلی مقدار پروتئین موجود در هر ماده ی غذایی تعیین کننده مقدار دریافت فنیل آلانین است. منبع مصنوعی این اسید آمینه شیرین کننده ی آسپارتام ( ان- ال- آلفا- آسپارتیل- ال فنیل آلانین- ۱- متیل استر) می باشد (داریوش فرهود، ۸۷).

فنیل آلانین به دنبال هضم پروتئین دریافتی به صورت فنیل آلانین آزاد در آمده و انتقال آن از طریق سیستم کوترانسپورت سدیم و اسید آمینه انجام می شود و غلظت پلاسمایی طبیعی آن حدود ۵۰ میکرومول در لیتر است. ورود این اسید آمینه از خون به داخل سلول از طریق چندین عامل انتقال دهنده انجام می شود. انتقال از سد بین خون و مغز از طریق ترانسپورتر، غیروابسته به سدیم بوده و در مسیر انتقال در سلول های اندوتلیال مویرگ ها وابسته به سدیم است. در مسیر انتقال در سلول های اندوتلیال مویرگ های مغزی، فنیل آلانین با سایر آمینو اسیدهای طبیعی بزرگ (LNAAs) شامل والین، تریپتوفان، لوسین، ایزولوسین، متیونین، تیروزین و هیستیدین برای انتقال رقابت می کند. اولین مرحله در کاتابولسیم ال- فنیل آلانین، تبدیل آن به ال- تیروزین است که در این واکنش فروآنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز از تتراهیدروبیوپترین ($BH_4$) برای تبدیل فنیل آلانین به تیروزین استفاده می کند.




شکل ۱-۴ واکنش تبدیل فنیل آلانین به تیروزین در حضور آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز و کوفاکتورش

پروتئین عضله ی اسکلتی و سایر بافت ها، حاوی ۵/۳ ٪ فنیل آلانین هستند. در طی گردش طبیعی پروتئین، فنیل آلانین آزاد شده و مجدداً برای سنتز پروتئین یا سایر مسیرهای متابولیکی در دسترس قرار می گیرد. میزان آزاد شدن روزانه فنیل آلانین از کاتابولیسم پروتئین، در افراد سالم حدود ۱۲ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن است و ترومای شدید، عفونت سیستمیک یا عدم تحرک که سبب افزایش کاتابولیسم پروتئین می شوند، آزاد شدن فنیل آلانین را افزایش می دهند. در شرایطی که غلظت پلاسمایی فنیل آلانین طبیعی باشد، فقط چند گرم فنیل آلانین در دفع کلیوی ظاهر می شود که تقریباً تمام آن به وسیله ی سلولهای اندوتلیال توبول پروگزیمال بازجذب می شود. کاهش دریافت پروتئین به کمتر از مقدار مورد نیاز، سبب کند شدن تبدیل فنیل آلانین به تیروزین می گردد و فعالیت فنیل آلانین هیدروکسیلاز نیز به صورت آلوستریک توسط فنیل آلانین تنظیم می شود (کوهلمییر[1]، ۲۰۰۳).

## ۱-۶ فنیل آلانین هیدروکسیلاز

کاتالیزور فنیل آلانین هیدروکسیلاز (PAH) که فنیل آلانین ۴- مونواکسیژناز هم نامیده می شود، آنزیم کبدی هشت رشته ای محتوی آهن است که ساختار فضایی ویژه ای دارد و هیدروکسیلاسیون آمینو اسید ضروری ال- فنیل آلانین به ال- تیروزین را در حضور کوفاکتور تتراهیدروبیوپترین ($BH_4$) کاتالیز می نماید و تخریب آمینو اسید توسط آن صورت می گیرد. کاتابولیسم فنیل آلانین و فعالیت فنیل آلانین هیدروکسیلاز عمدتاً به کبد مرتبط است. در انسان آنزیم فنیل آلانین هیدروکسیلاز به صورت مخلوطی از دیمر و تترامر وجود دارد. هر مونومر اندازه ای در حدود ۵۰ kDa داشته و از ۴۵۲ آمینو اسید تشکیل شده است. فنیل آلانین هیدروکسیلاز برای اینکه عمل کند به تتراهیدروبیوپترین ($BH_4$) به عنوان کوفاکتور، مولکول اکسیژن و مکان فعال آهن ($Fe^{2+}$) برای تبدیل فنیل آلانین به تیروزین نیاز دارد (کیم[2] ۲۰۰۴، ویلیامز ۲۰۰۸).

[1] Kohlmeier M.

[2] Kim, W.