تشخیص بیوشیمیایی بیماری گالاکتوزمی کلاسیک[1] سنجش کیفی آنزیم

دکتر فرزانه میرزاجانی
(پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی)

ندا نقیب‌زاده طباطبایی
(پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران)

سهیلا قندیلی
(پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک مولکولی)

رضا میرفخرایی
(پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی)

مقدمه.....

گالاکتوزمی از بیماری‌های مادرزادی متابولیک می‌باشد که دارای الگوی وراثتی اتوزومال مغلوب است. واژه گالاکتوزمی به معنای افزایش میزان قند گالاکتوز در خون می‌باشد که این امر می‌تواند به دلیل اختلال در عمل‌کرد یکی از سه آنزیم گالاکتوکیناز[2]، گالاکتوز-۱- فسفات یوریدیل ترانسفراز[3] (GALT) و یا یوریدیل دی‌فسفوگالاکتوز -٤- اپی‌مراز[4] باشد. گالاکتوزمی اغلب در اثر نقص در آنزیم GALT ایجاد می‌شود که باعث تولید سطح بالایی از متابولیت گالاکتوز -۱- فسفات می‌گردد و اصطلاحا گالاکتوزمی کلاسیک نامیده می‌شود(۱). ژن این آنزیم بر روی کروموزوم 9p13 قرار دارد.

فراوانی متوسط این بیماری در دنیا یک در هر ٦٢٠٠٠ تولد می‌باشد(۲). وقوع بیماری در جمعیت سفیدپوستان بین ۱:٤٠٠٠٠ تا ۱:٦٠٠٠٠ تولد زنده متغیر است(۳). از فراوانی این بیماری در ایران برآورد دقیقی در دست نمی‌باشد.

رعایت رژیم غذایی فاقد لاکتوز و گالاکتوز در نوزادان مبتلا به گالاکتوزمی از همان بدو تولد باعث می‌شود بسیاری از علائم به ویژه عقب‌ماندگی ذهنی در این بیماران بروز پیدا نکند به همین جهت تشخیص به موقع و زودهنگام این بیماری، کمک شایان به درمان این بیماران می‌نماید.

در حال حاضر سنجش کیفی آنزیم GALT برای اولین بار در ایران در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری راه‌اندازی شده است و این پژوهشگاه ضمن پاسخگویی به نیاز جامعه پزشکی آماده خود را جهت آموزش و انتقال تجربیات به سایر مراکز درمانی اعلام می‌دارد.

علائم بالینی.....

علائم بیماری معمولا پس از شیرخوارگی ظاهر می‌گردد و به دودسته علائم اولیه و علائم بلند مدت تقسیم می‌شوند.

علائم اولیه

این گروه از علائم به مرور پس از تغذیه با شیر نمایان می‌شوند و با مصرف شیر رژیمی جبران‌پذیر هستند. از جمله این علائم عبارتند از: امتناع از شیرخوردن، استفراغ مکرر و اسهال. علائم بعدی شامل بی‌حالی، بزرگی کبد و عفونت با میکروارگانیسم‌های منفی است که کمی دیرتر ظاهر می‌گردد.

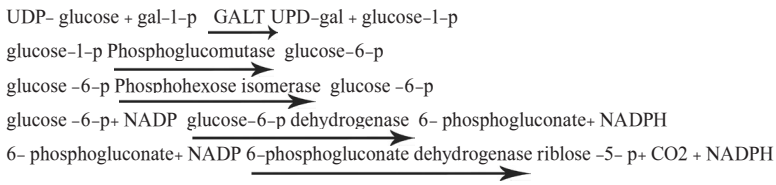
نشانه‌های دیگر نظیر آب آوردن شکم، کم‌خونی همولیتیک، کاهش قندخون، وجود پروتئین در ادرار می‌باشند. وجود مواد احیاءکننده (غیر از گلوکز) در ادرار، وجود باند گالاکتوز در ادرار (گالاکوزوریا[5])، افزایش بیلی‌روبین خون، افزایش ترانس آمنیازهای کبدی، افزایش اسیدهای آمینه پلاسما به ویژه فنیل آلانین، تیروزین و میتونین و بروز بیماری‌های کلیوی (اسیدوز متابولیک، وجود آلبومین و اسید آمینه در ادرار) از دیگر علائم این بیماری هستند.

علام بلند مدت

شامل اختلالات عصبی روانی، نقصان در رشد، اختلالات حرکتی، آب مروارید و نقص تخمدان‌ها در نوزادان دختر می‌باشد.

اساس آزمون سنجش کیفی فعالیت آنزیم GALT در گلبول های قرمز خون (روش Butler , Baluda)(4)

در گلبول‌های قرمز خون که به‌طور طبیعی حاوی آنزیم GALT می‌باشند، آنزیم فوق می‌تواند واکنش‌هایی آنزیمی متوالی تبدیل سوبسترای گالاکتوز -۱- فسفات و یوریدین -۵- دی فسفوگلوکز به محصول نهایی یوریدین -۵- دی‌فسفوگالاکتوز و گلوکز -۱- فسفات را انجام دهد که نهایتا منجر به تبدیل NADP به NADPH و تولید نورفلورسنت می‌گردد. در حالی که در بیماران مبتلا به گالاکتوزمی کلاسیک به دلیل نقص یا فقدان آنزیم GALT (فقدان اولیه آنزیم سری واکنش‌های آنزیمی) واکنش‌های متوالی انجام نخواهد شد.



در این روش از ۰/۵ میلی‌لیتر خون هپارینه که از بیماران و افراد خانواده آنها گرفته شده بود، برای سنجش آنزیم GALT در گلبول‌های قرمز استفاده می‌شود. نمونه خون بیمار در مقایسه با خون فرد سالم و نمونه کنترل مثبت (بیمار مبتلا به گالاکتوزمی کلاسیک) در معرض واکنش بیوشیمیایی قرار گرفته و محصول نهایی فلورسنت در زیر نور فرابخش در فواصل زمانی مشخص رویت می‌گردد. باید دقت کرد که چنانچه فرد بیمار خون دریافت کرده باشد، با انجام این آزمایش سطح آنزیم GALT در حد طبیعی خواهد بود که این امر به دلیل گلبول‌های قرمز طبیعی انتقال یافته است.

مواد مورد نیاز.....

- نمک یوریدین -۵- دی فسفوگلوکز دی‌سدیم[6] (ICN)
- نمک گالاکتوز -۱- فسفات دی‌پتاسیم[7] (Sigma)
- نمک NADP دی‌سدیم[8] (ICN)
- نمک EDTA دی‌سدیم[9] (Merck)
- ساپونین[10] (ICN)
- تریس‌بازی[11] (Boehringer)
- اسید استیک گلاسیال (Merck)
- کلرید سدیم (Merck)

مواد بالا در دمای اتاق نگهداری شد.

- کاغذ واتمن شماره۱ [12]

آماده سازی محلول ها..

● یوریدین -۵- دی‌فسفوگلوکز با غلظت ۹/۵ میلی‌مول در لیتر:

۹/۷ میلی‌گرم ازماده فوق در ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شود این محلول ناپایدار بوده و باید در زمان استفاده به صورت تازه تهیه گردد.

● گالاکتوز -۱- فسفات با غلظت۲۷ میلی‌مول در لیتر:

۱۱/۵میلی‌گرم از ماده فوق در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌گردد.

● NADP با غلظت ۶/۶ میلی‌مول در لیتر:

۱۰/۶ میلی‌گرم از ماده فوق در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و تا دو هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پایدار می‌ماند.

● EDTA با غلظت ۰/۴۵ میلی‌مول در لیتر:

۱۰ میلی‌گرم از ماده فوق در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شود. این محلول چندین ماه در ٤ درجه سانتیگراد قابل نگهداری می‌باشد.

● ساپونین با غلظت۲۵ گرم در لیتر:

۱۲۵ میلی‌گرم از ماده فوق در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردد. این محلول دردمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود که در این دما تا دو هفته پایدار می‌ماند.

● بافر تریس - استات (PH=8) با غلظت ۰/۷۵ میلی‌مول در لیتر:

٤/۵ گرم از تریس بازی در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردد و به آن قطره‌قطره اسید استیک اضافه شد تا PH آن به ۸ برسد، سپس با آب مقطر حجم آن به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری که در صورت عدم تغییر PH تا چندین ماه در این دما قابل نگهداری می‌باشد.

● کلرید سدیم با غلظت ۰/۱۵ میلی‌مول در لیتر (saline):

۰/۹ گرم از ماده فوق در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر ح گردید ودر دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود و تا ٦ ماه پایدار می‌ماند.

● مخلوط واکنش حاوی سوبسترا (آزمایش):

محلول‌های ذیل با مقادیر ذکرشده با یکدیگر مخلوط می‌گردند:

UDP glucose (محلول شماره ۱)
..... ۲۰۰ میکرولیتر

Galactoe -1- phosphate(محلول شماره ۲)
..... ٤۰۰ میکرولیتر

NADP (محلول شماره ۳)
..... ٦۰۰ میکرولیتر

EDTA (محلول شماره ٤)
..... ۱۵۰ میکرولیتر

Saponin (محلول شماره ۵)
..... ۸۰۰ میکرولیتر

Tris/ acetate buffer (محلول شماره ٦)
..... ۲ میلی‌لیتر

Distilled water (آب مقطر)
..... ۸۵/۱ میلی‌لیتر

حجم نهایی ٦ میلی‌لیتر خواهد شد که در مقادیر ۲۰۰ میکرولیتری در ویال‌های برچسب خورده با نام (آزمایش) تقسیم می‌گردد. این ویال‌ها در دمای۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و تا ۳ ماه پایدار می‌باشند.

● **مخلوط واکنش بدون سوبسترا (شاهد):**

محلول‌های ذیل بامقادیر ذکر شده با یکدیگر مخلوط می‌گردند:

NADP (محلول شماره ۳)
..... ۸۰۰ میکرولیتر

EDTA (محلول شماره ٤)
..... ۱۵۰ میکرولیتر

Saponin محلول شماره ۵
..... ۸۰۰ میکرولیتر

Tris/ acetate buffer (محلول شماره ٦)
..... ۱/۸ میلی‌لیتر

Distilled water (آب مقطر)
..... ۲/٥٤ میلی‌لیتر

حجم نهایی ٦ میلی‌لیتر خواهد شد که در مقادیر ۲۰۰ میکرولیتری در ویال‌های برچسب خورده بانام (شاهد) تقسیم می‌گردد. این ویال‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده و تا ۳ ماه پایدار می‌باشند.

روش کار.....

ویال‌های حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر خون هپارینه (نمونه بیمار، پدر و مادر بیمار) با شرایط ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌گردند.

● پس از سانتریفوژ پلاسما دور ریخته شده و هم حجم گلبول‌های قرمز، محلول Saline اضافه می‌گردد. سپس مواد داخل ویال را خوب مخلوط کرده و سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه در زمان ۵ دقیقه تکرار می‌گردد.

● مرحله ۲، دو بار دیگر تکرار گردیده تا گلبول‌های قرمز کاملا شسته شود.

● مراحل بالا برای یک نمونه کنترل طبیعی (شخص سالم) نیز انجام می‌شود.

● یک نمونه حاوی گلبول قرمز فرد بیمار مبتلا به گالاکتوزمی کلاسیک که قبلا شسته شده ودر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود، ذوب می‌گردد.

● به ازاء هر نمونه مورد آزمایش و هر نمونه کنترل ۱ ویال شاهد و ۱ ویال آزمایش از ۲۰- درجه سانتی‌گراد خارج شده، ذوب گردیده و نام هر فرد روی آن درج شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود.

● به هر ویال شاهد و آزمایش نام‌گذاری شده ۱۰ میکرولیتر از گلبول قرمز همان فرد اضافه کرده و خوب مخلوط می‌گردد و ویال‌ها بلافاصله در بن‌ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شوند.

● کاغذ واتمن شماره ۱ به طریق زیر علامت‌گذاری شود.

۱۲۰دقیقه	٦۰دقیقه	۳۰دقیقه	نمونه
آزمون شاهد	آزمون شاهد	آزمون شاهد	کنترل طبیعی
آزمون شاهد	آزمون شاهد	آزمون شاهد	بیمار
آزمون شاهد	آزمون شاهد	آزمون شاهد	کنترل بیمار

● بعد از گذشت ۳۰ دقیقه از شروع انکوباسیون، ۱۰ میکرولیتر از هر ویال شاهد و ۱۰ میکرولیتر از هر ویال آزمایش روی کاغذ واتمن و در محل مربوطه نمونه‌گذاری شده و ویال‌های مجددا به بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌گردد.

● پس از خشک شدن لکه‌های خون در مجاورت هوا، کاغذ در زیر نور فرابنفش با طول موج بلند مشاهده گردیده و نور فلورسنت در نمونه کنترل طبیعی، نمونه بیمار و خانواده‌اش و همچنین نمونه کنترل گالاکتوزمی پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با یکدیگر مقایسه می‌شود.

٦۰ دقیقه پس از شروع انکوباسیون مرحله ۱۰ و ۹ تکرار می‌شوند.

● باگذشت دو ساعت از ابتدای انکوباسیون مرحله ۱۰ و ۹ تکرار می‌گردند.

نکات.....

● نقاط شاهد نباید در هیچ کدام از نمونه‌ها فلورسانت شوند.

● افراد طبیعی در نیم ساعت اول خاصیت فلورسانت را نشان خواهند داد.

● هتروزیگوت[13]های طبیعی (افراد ناقل) در ساعت اول ودوم خاصیت فلورسانت را نشان می‌دهند که البته میزان آن در ساعت دوم بیشتر خواهد بود.

● هموزیگوت[14]های مبتلا به گالاکتوزمی کلاسیک نه در ساعت اول و نه در ساعت دوم خاصیت فلورسانس را نشان نمی‌دهند، اگر چه نقص در هر یک از آنزیم‌های سلول قرمز که در این واکنش‌های زنجیره‌ای نقش دارند، می‌تواند همین نتیجه را به دنبال داشته باشد لذا اگر هیچ نوع فلورسانسی در ساعت اول و دوم مشاهده نشد لازم است که آزمون سنجش کمی GALT جهت تایید تشخیص گالاکتوزمی انجام شود.

● افراد هتروزیگوت برای گالاکتوزمی (ناقلین) و هموزیگوت‌های واریانت دوارت[15] (نوع خفیف‌تر بیماری) ممکن است در ساعت اول فلورسانس ضعیف نشان دهند و یا هیچ خاصیت فلورسانسی ایجاد نکند، اما در ساعت دوم فلورسانس طبیعی و یا نزدیک به طبیعی ایجاد کنند.

پی‌نوشت:.....

1. Classical galactosemia
2. Galactokinase
3. Galactose 1 phosphate uridyl transferase
4. Uridyl di phospho galactose -4-epimeras
5. Galactoseuria
6. Uridine 5- diphosphoglucose disodium salt
7. Galactose -1- phosphate dipotassium salt
8. NADP disodium salt
9. EDTA disodium salt
10. Saponin
11. Tris base
12. Whatman No.1 filter paper
13. Heterozygote
14. Homozygote
15. Duart

نشریه تشخیص آزمایشگاهی فرا رسیدن سال نو را به تمامی خوانندگان محترم، تبریک عرض نموده و آرزوی سالی خوش و پربرکت برای این عزیزان دارد.

REFERENCES

1. Shield JPH, Wadsworth EJK, Mac Donald A, Stephenson A, Tyfield L, Holton JB. (2000): The relationship of genotype to cognitive outcome in galactosemia. Arch Dis Child. 83:248-50

2. Suzuki M, West C, Beutlr E. (2001): Large-scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan- ethnic population. Hum Genet. 109: 210-15.

3.Podskarbi T, Rechardt J, Shin YS. (1994): Studies of DNA in galactose -1- phosphate uridyl transferase deficiency and the duart variant in Germany. J Inherited Metab Dis. 17: 149-50.

4. Beutler E, Baluda MC. (1966): A simple spot screening tst for alactosemia. J Lab Clin Med. 68:137-41.