

ارزیابی فعالیت سرمی آنزیم مبدل آنژیوتانسین در بیماران ایرانی مبتلا به گوشه نوع ۱ و ارتباط آن با حذف و الحاق (I/D) در اینترون ۱۶ آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE)

مرتضی غضنفری جبین^۱، شهره خاتمی^۲، هادی مظفری^۳، ابوالفضل فاتح^۴، مریم مبارکی^۵، محمد تقی خانی^۶

^۱ کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس

^۲ دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، انستیتو پاستور ایران

^۳ استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

^۴ استادیار، گروه میکروبی شناسی و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، انستیتو پاستور ایران

^۵ کارشناسی ارشد، گروه میکروبی شناسی، انستیتو پاستور ایران

^۶ استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

سابقه و هدف: بیماری گوشه نوعی بیماری اتوزومال مغلوب است که نتیجه موتاسیون در ژن β گلوکوسربروزیداز است. هدف در این مطالعه، سنجش سطح فعالیت آنزیم ACE در بیماران ایرانی گوشه تیپ ۱ و همچنین بررسی پلی مورفیسم (I/D) در اینترون ۱۶ ژن ACE به عنوان یک مارکر کمکی در تشخیص و پایش بیماری است.

روش بررسی: نمونه گیری از ۲۹ بیمار (میانگین سنی ۱۰/۰۴ سال) و ۶۰ نفر از افراد سالم (میانگین سنی ۷/۳۱ سال) انجام شد. مراحل کار شامل استخراج DNA از خون تام، تعیین پلی مورفیسم (I/D) با روش PCR و سنجش فعالیت آنزیم ACE بود.

یافته‌ها: میانگین میزان فعالیت ACE در بیماران ۲۳۱/۰۷۷ U/L و در افراد سالم ۵۶/۰۳ U/L بود که در بیماران ۴ برابر حد طبیعی افزایش یافته بود. نتیجه بررسی پلی مورفیسم I/D شامل ۶ II (۲۰/۷٪)، ۹ DD (۳۱٪) و ۱۴ ID (۴۸/۳٪) بود که با بررسی آماری با استفاده از آزمون ANOVA بین ژنوتیپ DD و ژنوتیپ II و تاثیر آن در سطح فعالیت آنزیم اختلاف معنی داری مشاهده شد. نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، می توان از سنجش آنزیم ACE و پلی مورفیسم I/D به عنوان مارکر کمکی در مانیتورینگ بیماری و کنترل درمان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: بیماری گوشه، آنزیم مبدل آنژیوتانسین ACE، β گلوکوسربروزیداز، پلی مورفیسم (I/D).

مقدمه

بیماری گوشه نوعی بیماری اتوزومال مغلوب است که به دنبال موتاسیون در ژن GBA یا β -گلوکوسربروزیداز روی می دهد. این ژن شامل یازده آگزون است و روی کروموزوم 1q21 قرار دارند و یک ژن کاذب با همولوژی ۹۵٪ نیز در پایین دست ژن

اصلی قرار دارد. تاکنون بیش از ۳۰۰ جهش مختلف برای این بیماری شناسایی شده است. شایع ترین جهشی که باعث ایجاد تیپ I این بیماری می شود، جایگزینی تک جفت بازی در کدون ۳۷۰ یا اسید آمینه N370S است که تقریباً مسئول ۷۰٪ از آللهای موتانت در یهودیان اشکنازی مبتلا به گوشه است. جایگزینی تک جفت بازی در کدون ۴۴۴ (L444P) نیز شایع ترین جهشی است که در گوشه نوروپاتیک یا تیپ II شناسایی شده است (۴-۱). بیماری به سه تیپ I (تیپ مزمن بالغین)، II (تیپ حاد نوروپاتیک اطفال) و III (تیپ تحت حاد

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوشیمی بالینی، محمد تقی خانی

(email: taghi_mo@modares.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۱۰/۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۵/۱۲/۷

ویژگی اصلی آنزیم ACE کاتالیز شکستن یک دی پپتید از انتهای C ترمینال اولیگوپپتیدهایی است که سوبسترای این آنزیم هستند (۱۲، ۱۳). برادی کینین یک سوبسترای خوب برای ACE است که ثابت ویژگی (kcat/km) برای آن برابر ۳۹۰۰-۵۰۰۰ mM-1s-1 است که بالاتر از ثابت ویژگی (kcat/km) آن برای آنژیوتانسین I (147-189-mM-1s-1) است (۱۴). پلی مورفیسم I/D شامل حذف ۲۸۷ جفت باز از خانواده توالی‌های تکرار شونده Alu از اینترون ۱۶ و یا وجود این توالی است، که نتیجه آن ایجاد سه ژنوتیپ DD، II به صورت هموزیگوت و ID به صورت هتروزیگوت است. افرادی که در آنها ژنوتیپ DD وجود دارد ۳۰٪ الی ۶۰٪ سطح آنزیم ACE بالاتر از افرادی است که ژنوتیپ آنها II است (۹، ۱۵، ۱۶). همان‌طور که ذکر شد از مارکرهای بیوشیمیایی متعددی برای تشخیص بیماری گوشه مورد استفاده قرار گیرد. ما در این مطالعه به ارزیابی فعالیت آنزیم ACE در بیماران مبتلا به بیماری گوشه نوع ۱ و مقایسه آن با افراد نرمال پرداختیم، تا در صورتی که فعالیت این آنزیم در بیماران مبتلا به گوشه نوع ۱ به طور معنی‌داری نسبت به افراد نرمال اختلاف مشاهده شود بتوان از آن به عنوان یک مارکر کمکی موثر در تشخیص و همچنین در کنترل درمان این بیماران مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه سنجش سطح فعالیت آنزیم ACE در بیماران ایرانی گوشه و همچنین بررسی پلی مورفیسم حذف والحق (I/D) در اینترون ۱۶ ژن ACE بود. پلی مورفیسم حذف و جایگزینی بر روی اینترون ۱۶ باعث ایجاد سه ژنوتیپ DD، II به صورت هموزیگوت و ID به صورت هتروزیگوت می‌شود. طبق آزمایشات انجام گرفته در ۲۹ بیمار میانگین میزان فعالیت ACE برابر ۲۳۱/۰۷U/L است که ۴ برابر حد نرمال افزایش یافته است. نتیجه بررسی پلی مورفیسم (I/D) در این ۲۹ بیمار شامل ۶ (٪۲۰/۷) II، ۹ (٪۳۱) DD و ۱۴ (٪۴۸/۳) ID به دست آمد که با بررسی آماری با استفاده از آزمون ANOVA ارتباط معنی‌داری با سطح فعالیت آنزیم ACE داشت. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان از سنجش سطح فعالیت آنزیم ACE به عنوان عامل کمکی در تشخیص بیماری استفاده کرد و همچنین به عنوان یک فاکتور مهم در کنترل درمان استفاده کرد. از پلی مورفیسم I/D با توجه به نقشی که در سطح فعالیت آنزیم ACE دارد، می‌تواند در افزایش اختصاصیت تست ما اثر داشته باشد.

نوروپاتی‌یک کودکان و بالغین) تقسیم می‌شود که براساس میزان فعالیت آنزیم گلوکوسربروزیداز، نوع جهش و علائم بالینی قابل شناسایی هستند (۷-۵).

۱. تیپ I بیماری گوشه (GD1)

این تیپ، شایع‌ترین فرم بیماری گوشه است که معمولاً باعث بیماری‌های عصبی نمی‌شود. این بیماری در بین یهودیان اشکنازی شیوع بالایی دارد، به طوری که در این جامعه از هر ۲۰-۱۵ نفر ۱ نفر ناقل و تقریباً ۱ نفر از هر ۱۰۰۰-۸۰۰ نفر برای ژن بیماری هموزیگوت است. تیپ I گوشه یک اختلال هتروژن است که ممکن است در دوران کودکی یا در بزرگسالی (در سنین بالای ۶۰ سال) نمایان شود. احتمالاً بیشتر موارد بیماری هم که تشخیص داده نمی‌شوند، بدون علائم هستند. افرادی که با علائم بالینی مراجعه می‌کنند، اغلب هپاتواسپلنومگالی، لنفادنوپاتی، پیگمانتاسیون پوست و تشکیل پوست زرد-قهوه‌ای، لکوپنی، آنمی نورموکرومیک، بیماری اسکلتی، ضایعات استخوانی، بزرگی خمره مانند قسمت تحتانی فمور و ارتشاح مغز استخوان دارند که منجر به پان سایتوپنی و کاهش تمام رده‌های خونی می‌شود. در ادامه خصوصیات این نوع از بیماری گوشه به تفصیل بیان خواهد شد (۸، ۹).

۲. تیپ II بیماری گوشه (GD2)

تیپ II، فرم نوروپاتی‌یک حاد بیماری است که با اختلالات عصبی در اوایل دوران نوزادی تظاهر یافته و اغلب قبل از سن ۲ سالگی باعث مرگ بیمار می‌شود (۸).

۳. تیپ III بیماری گوشه (GD3)

تیپ III فرم نوروپاتی‌یک تحت حاد است که به ضایعات نورودژنراتیو با پیش روی کندی منجر می‌شود، که به آن تیپ تحت حاد نوروپاتی‌یک کودکان و بالغین نیز می‌گویند (۸).

تشخیص بیماری

تشخیص بیماری با سنجش فعالیت آنزیمی β گلوکوسربروزیداز در لوکوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و ادرار و بر اساس وجود سلول‌های گوشه در بیوپسی از هر سه اندام مغز استخوان، کبد و طحال است. امروزه برای تشخیص گوشه، دیگر انجام بیوپسی ضروری نیست. سطح سرمی آنزیم کیتوتریوزیداز مشتق از ماکروفاژ افزایشی را نشان می‌دهد (۱۰، ۱۱). البته مارکرهای دیگری نیز ممکن است افزایش یابد که یکی از این مارکرها آنزیم مبدل آنژیوتانسین ACE است که ما در این مطالعه آن را در بیماران ایرانی مبتلا به گوشه در مقایسه با افراد سالم مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روشها

با توجه به نبود آمارهای رسمی در کشور ایران، با نظر به اینکه شیوع این بیماری، در سایر کشورها حداقل حدود ۱ در ۷۰۰۰۰ نفر است و از طرفی حدود ۲۵ درصد جمعیت ایران سن زیر ۱۵ سال دارند و با در نظر گرفتن ۷۵ میلیون جمعیت کل، تعداد افراد بیمار زیر ۱۵ سال حداقل برابر ۲۷۰ نفر می شود، بنابراین تعداد افراد مورد نیاز برای مطالعه برابر جذر ۲۷۰ یعنی حداقل ۱۷ نفر کودک مبتلای زیر ۱۵ سال تعیین شد. نمونه گیری بر اساس معرفی و راهنمایی پزشک متخصص اطفال به بیماران و یا والدین بیمار، در انستیتو پاستور و مطب پزشک انجام شد. در تعیین تعداد افراد سالم نیز، اگر خطای محاسبه میانگین را نصف انحراف معیار به دست آمده در مطالعات قبلی در نظر بگیریم حدود ۲۷ نفر باید بررسی شوند. خوشبختانه با همکاری خوب پزشکان اطفال و والدین بیماران موفق به گرفتن نمونه از ۲۹ بیمار شدیم و از افراد سالم هم (چون تعداد بیماران ما بیشتر از تعداد محاسبه شده گرفته شد) ۶۰ نمونه تهیه شد. در این طرح، بر اساس نظر پزشک متخصص اطفال و پرونده بیمار، بیماران مبتلا به بیماری گوشه شناسایی و جهت مصاحبه، اخذ نمونه و معاینه توسط پزشک دعوت شدند. معیار ورود بیماران به این مطالعه بررسی سطح آنزیم گلوکوسربروزیداز و همچنین بررسی سطح آنزیم کیتوتیروزیداز بود که سطح این آنزیم در این بیماران بیشتر از سطح نرمال بود. در بعضی از بیماران سلول گوشه در بیوپسی مغز و استخوان مشاهده شده بود. همچنین موتاسیون‌های ژن گلوکوسربروزیداز در این بیماران در طرح دیگری که آن هم جزئی از طرح جامع بود مورد بررسی قرار گرفت.

افراد سالم بر اساس سوابق پزشکی، بررسی پزشک و بر این اساس که از لحاظ سن، جنس و نژاد با بیماران مطابق باشند و هیچ گونه بیماری خاصی نداشته باشند و در خانواده آنها بیماری متابولیک ارثی (ترجیحا از نوع ذخیره‌ای) وجود نداشته باشد، انتخاب شدند. به منظور رعایت ضوابط اخلاقی جاری در امور پژوهشی و رعایت حقوق مطالعه شونده‌گان پس از انتخاب افراد در هر دو گروه کنترل و بیمار، اهداف طرح برای والدین نامبرگان به صورت انفرادی (چهره به چهره) توضیح داده شد و در صورت موافقت ایشان با مشارکت در طرح رضایت نامه‌ای تکمیل و به امضاء ایشان رسید. پس از معاینه بیماران و افراد سالم توسط پزشک اطفال، ثبت شرح حال، سوابق پزشکی افراد مورد مطالعه و مشاهدات پزشک در خصوص تغییرات

ظاهری بیماران، از افراد بیمار و سالم در شرایطی که حداقل ۱۲ ساعت ناشتا باشند (به دلیل به حداقل رسیدن زمان ناشتایی در اندازه‌گیری لیپیدهای سرم) ۱۰ میلی لیتر خون تام گرفته شد و در دو لوله مجزا (۵ میلی لیتر در لوله حاوی EDTA جهت آزمایشات مولکولی و ۵ میلی لیتر نیز جهت جداسازی سرم و انجام تستهای بیوشیمیایی) ریخته شد. سپس نمونه‌ها با سانتریفوژ (R ۵۷۰۲ ساخت شرکت eppendorf آلمان) ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از جداسازی سرم و پلاسما، نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

الف- استخراج DNA از خون تام

برای استخراج DNA از خون تام از دو روش استفاده کردیم، یکی استفاده از روش فنل کلروفرم، که از این روش برای استخراج DNA از نمونه خون تام بیماران استفاده کردیم و دیگری استفاده از کیت استخراج DNA بود که از آن برای استخراج DNA از نمونه خون تام افراد سالم استفاده کردیم.

ب- تعیین پلی مورفیسم حذف و الحاق I/D در اینترون

۱۶ ژن ACE با روش PCR

در این مطالعه از پرایمرهایی استفاده شد که در مطالعه Vahid Felehgari et al مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور پرایمرها از شرکت سینا ژن خریداری شدند جدول ۱).

جدول ۱. پرایمرهایی استفاده شده در مطالعه

Oligo name	Sequence	GC% content	Tm(C°)
Forward	5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3'	۵۶/۳	۶۹/۴
Reverse	5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'	۵۶/۳	۷۱/۸

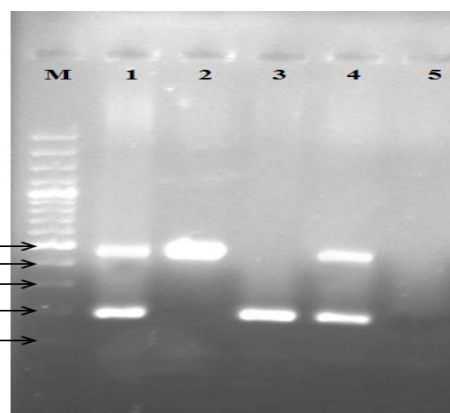
ج- سنجش فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین

برای سنجش فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین از کیت Biorex ACE diagnostics با شماره کد محصول PRODUCT CODE: BXCO176 استفاده کردیم.

تحلیل نتایج با نرم افزار SPSS (ver.16) انجام شد. از آزمون t مستقل برای مقایسه نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم ACE در بیماران و افراد سالم استفاده شد. برای بررسی فعالیت آنزیم ACE در ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم I/D در بیماران از آزمون آماری one-way ANOVA استفاده شد. در تمام مقایسه‌های آماری، با ضریب اطمینان ۹۵ درصد، مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از استخراج DNA از نمونه‌ها با روش فنل کلروفرم برای نمونه‌های بیمار و استفاده از کیت برای استخراج DNA نمونه‌های افراد سالم، برای تخمین میزان غلظت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه Nanodrop استفاده شد. غلظت نمونه‌های DNA استخراج شده از خون تام، در این مطالعه در محدوده ۲۵ تا ۳۰ نانوگرم در هر میکرولیتر و OD260/280 آنها بین ۱/۷ تا ۱/۹ بود. جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش ۸۹ نفر بود که میانگین سنی بیماران $10 \pm 8/5$ سال و میانگین سنی افراد سالم $7/3 \pm 3/5$ سال بود. در گروه بیماران ۱۱ مذکر و ۱۸ مؤنث و در گروه افراد سالم ۲۸ مذکر و ۳۲ مؤنث قرار گرفتند. سنجش فعالیت آنزیم ACE با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر کوباس میرا پلاس انجام شد که در گروه بیماران میانگین فعالیت آنزیم $231/07$ و در گروه افراد سالم $56/03$ بود. واکنش PCR قطعه مورد نظر در شرایط ایتیمایز مخصوص قطعه مورد نظر برای نمونه های بیمار و سالم انجام گرفت. پس از انجام PCR برای بررسی نتیجه، محصول را بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل

با توجه به شکل فوق M نشانگر مارکر ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ bp است، شماره ۱ تا ۴ نتیجه PCR نمونه‌هاست. همان طور که مشاهده می‌شود دو نوع باند ۱۹۰ bp و ۴۹۰ bp دیده می‌شود، شماره ۱ و ۴ دو باند دارد که بیانگر ژنوتیپ I/D، شماره ۲ یک باند ۴۹۰ bp دارد که بیانگر ژنوتیپ I/I و شماره ۳ یک باند ۱۹۰ bp دارد که بیانگر ژنوتیپ D/D است، شماره ۵ بلانک است. بین میانگین فعالیت آنزیم بین افراد بیمار و سالم اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

تعیین حد مرزی در سنجش فعالیت آنزیم ACE در جمعیت مورد مطالعه در بسیاری از آزمون‌های تشخیصی، نتیجه

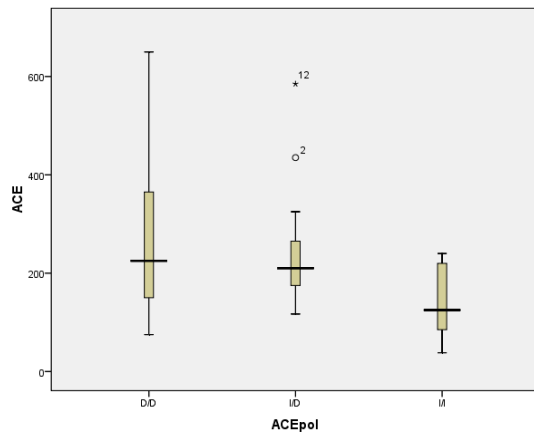
آزمایش به صورت یک عدد گزارش شد که لازم است فرد تفسیر کننده بر اساس اینکه مقدار مذکور از یک حد نصاب، که حد مرزی نامیده می‌شود، بالاتر یا کمتر است، نتیجه را مثبت یا منفی تلقی کند. در این تست‌های تشخیصی اگر حساسیت آزمون تشخیصی افزایش یابد، به تبع آن، ویژگی کاهش می‌یابد؛ بنابراین نقطه ای را باید تعیین کنیم تا هم حساسیت و هم ویژگی بالا باشد. برای به دست آوردن حد مرزی که حساسیت و ویژگی آزمون تشخیصی در آن نقطه در حد ماکزیمم باشد دو رویه را می‌توان اعمال کرد:

۱. با استفاده از آزمون تشخیصی نقاط برش مختلفی را مشخص می‌کنیم و متناسب با آنها، حساسیت و ویژگی آزمون را در این نقاط محاسبه می‌کنیم. نقطه برشی که مجموع حساسیت و ویژگی در آن نقطه بیشترین حد ممکن باشد، انتخاب می‌شود.

۲. می‌توان از نمودارهای راک که توسط نرم افزارهای آماری در اختیار محقق قرار می‌گیرد استفاده کرد. در این نمودار محورهای عمودی و افقی به ترتیب مقدار "حساسیت" و "ویژگی - ۱" را نمایش می‌دهند. نقطه‌ای که کم‌ترین فاصله را تا نقطه یک بر روی محور عرض داراست، نقطه برش مطلوب است. در صورتی که حساسیت و ویژگی آزمون تشخیصی ۱۰۰ درصد باشد، سطح زیر منحنی راک برابر یک به دست خواهد آمد و هرچه حساسیت و ویژگی کاهش یابد، مقدار این سطح نیز کاهش می‌یابد. در مقایسه چندین آزمون تشخیصی با همدیگر، آزمونی مناسب‌تر است که سطح زیر منحنی راک آن بیشتر باشد.

در این آزمون نتایج حاصل از سنجش فعالیت آنزیم را با استفاده از نرم افزار SPSS و استفاده از دستور ROC Curve، نمودار را رسم کردیم. در این نمودار منحنی حساسیت (sensitivity) در مقابل ۱- ویژگی (specificity) رسم شد. پس از اینکه این نمودار رسم شد، اعداد حاصل از حساسیت (sensitivity) در مقابل ۱- ویژگی (specificity) را در برنامه اکسل وارد کرده و ۱- ویژگی (specificity) را به ویژگی (specificity) تبدیل کردیم و اعداد حساسیت را مقابل ویژگی نوشته شد و نقاطی را انتخاب کردیم که در مجموع بیشترین مقدار حساسیت و ویژگی را داشته باشند.

با توجه از نتایج حاصل از نمودار ۱ در مقدار 109 U/L از فعالیت آنزیم بیشترین مقدار حساسیت و ویژگی (Se+Sp) را داشتیم که از این نقطه به عنوان حد مرزی یا Cut off استفاده کردیم. این نقطه برش در جایی از نمودار است که بیشترین سطح زیر نمودار را پوشش می‌دهد.



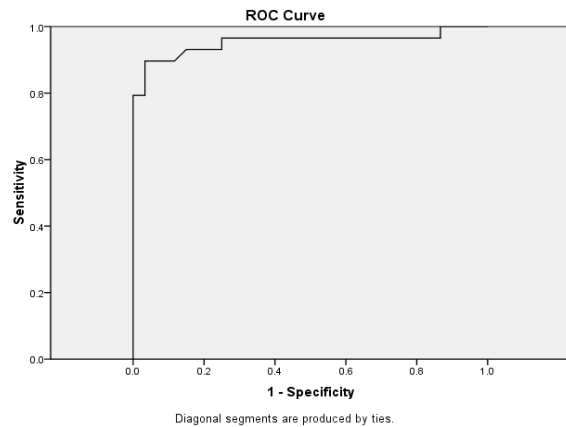
نمودار ۲. نمودار Boxplot برای حذف داده های پرت

در اطلاعات آزمون Tukey بین ژنوتیپ DD و ژنوتیپ II اختلاف مشاهده شد و بین ژنوتیپ DD و افزایش فعالیت آنزیم ACE و ژنوتیپ II و کاهش فعالیت آنزیم ACE ارتباط وجود داشت.

بحث

همان طور که ذکر شد، بیماری گوشه یکی از شایع ترین بیماری های ذخیره لیزوزومی است. در حال حاضر، در مرکز مدیریت بیماری های غیرواگیر وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی طرحی جامع تحت عنوان "تعیین روش های استاندارد شده و کار آمد برای مدیریت بیماری های متابولیک ارثی در ایران" در جریان است و این طرح جزئی از طرح جامع کنترل بیماری های متابولیک ارثی در ایران است. بیماری های متابولیک ارثی در اغلب موارد توارث اتوزوم مغلوب دارند؛ لذا، میانگین افراد مبتلا به این بیماری ها به دلیل ازدواج های فامیلی در ایران بیشتر از میانگین پیش بینی شده در دنیا است و بدین دلیل این بیماری ها به عنوان بیماری های بومی در ایران شناخته می شوند. در میان این بیماری ها اشکالی از گلیکواسفنگولیپیدوزها نیز به چشم می خورد.

در دنیا مطالعات جامع و گسترده ای درباره تشخیص قبل از تولد، افزایش صحت و اختصاصیت تشخیص این بیماری ها از اختلالات دیگر و در موارد مشکوک بررسی مکانیسم های بروز انواع عوارض بیماری و بهبود روش های درمانی و ارتقاء سطح زندگی مبتلایان به این دسته از بیماری ها انجام می شود. گام اساسی در تشخیص و مانیتورینگ این اختلالات انجام آزمایش های دقیق، ارزیابی فعالیت آنزیمی و تشخیص قاطع بیماری با روش های ژنتیک مولکولی و ... است. با توجه به



نمودار ۱. ROC Curve. سنجش فعالیت آنزیم در بیماران و افراد سالم

پس از تعیین Cut off point، نتایج میزان فعالیت آنزیم ACE را در بیماران و افراد سالم مورد بررسی قرار دادیم. بین میانگین فعالیت آنزیم در جمعیت مورد مطالعه بر اساس گروه بندی با نقطه برش، اختلاف معنی داری وجود داشت. فراوانی آلی و ژنوتیپی در جمعیت سالم و بیمار از بررسی پلی مورفیسم اینترون ۱۶ ژن ACE در جدول ۲ مشاهده می شود.

جدول ۲. فراوانی آلی و ژنوتیپی اینترون ۱۶ ژن ACE در جمعیت سالم و بیمار

	فراوانی ژنوتیپی					
	جمعیت	II	ID	DD	I	D
فراوانی آلی						
بیمار	۶	۱۴	۹	۱۳	۱۶	
(۲۹ نفر)	٪۲۰/۷	٪۴۸/۳	٪۳۱	٪۴۴/۸	٪۵۵/۲	
سالم	۱۴	۲۸	۱۸	۲۸	۳۲	
(۶۰ نفر)	٪۳۳/۳	٪۴۶/۷	٪۳۰	٪۴۶/۷	٪۵۳/۳	

در مورد فعالیت آنزیم ACE در ژنوتیپ های پلی مورفیسم I/D در بیماران اختلاف معنی داری وجود نداشت، البته بین ژنوتیپ DD و ژنوتیپ II اختلاف مشاهده شد، ولی به حد معنی دار نبود که یکی از دلایل این امر وجود داده های پرت است. راه های مختلفی برای داده های پرت وجود دارد که یکی از این راه ها استفاده از نمودار Boxplot است. پس از رسم Boxplot آن داده ها را که پرت هستند حذف کرده و دوباره آزمون one-way ANOVA را انجام دادیم (نمودار ۲). دلیل دیگری که نتایج ما علی رغم وجود اختلاف زیاد در میانگین بین ژنوتیپ های مختلف معنی دار نبود، تعداد کم نمونه ها بود.

سازی سنجش فعالیت آنزیم β -گلوکوسربروزیداز مورد آزمایش قرار گرفته و سالم بودنشان تایید شد.

در مطالعه حاضر، میانگین فعالیت آنزیم در بیماران نسبت به افراد سالم، افزایش چهار برابری را نشان می‌دهد. در میان بیماران ما، ۲۸ مورد بالاتر از حد طبیعی بودند که شامل ۹۷ درصد بیماران می‌شد. آزمایشات برای بیماران ۳ بار و برای افراد سالم ۲ بار تکرار شد. دلایل متعددی برای این افزایش ذکر شده است؛ از جمله در مطالعه Silverstein که علت آن را افزایش سلول‌های گوشه در طحال که فعالیت آنزیم در آنجا تا ۱۰ برابر حد نرمال افزایش دارد و سرازیر شدن مقدار زیادی آنزیم از طحال به خون که باعث افزایش ۳ تا ۴ برابری آن در خون می‌شود (۱۷). در مطالعه Aerts علت این افزایش را ناشی از آزاد شدن این آنزیم به طور مستقیم از خود سلول‌هایی دانست که با چربی انباشته شده‌اند. این سلول‌ها می‌توانند ماکروفاژ، فیبروبلاست و حتی سلول‌های اندوتلیال عروق و یا سلول‌های اندوتلیال ریه باشند. در این بیماران هیپاتومگالی و اسپلنومگالی وجود دارد که طبق بررسی‌های ما میانگین فعالیت آنزیم ACE در بیمارانی که هیپاتومگالی دارند برابر $235/5 \text{ U/L}$ است که تقریباً 60 U/L از بیمارانی که هیپاتومگالی ندارند $(175/9 \text{ U/L})$ بیشتر است. همچنین میانگین فعالیت آنزیم ACE در بیمارانی که اسپلنومگالی دارند برابر $243/5 \text{ U/L}$ است که تقریباً 67 U/L از بیمارانی که اسپلنومگالی ندارند $(171/2 \text{ U/L})$ بیشتر است.

همانطور که ذکر شد نقش اصلی آنزیم ACE در سیستم رنین آنژیوتانسین است که از نقش‌های عمده آن افزایش فشار خون است. در بررسی‌هایی که در این بیماران صورت گرفت مشاهده شد که این بیماران افزایش فشار خون ریوی دارند. افزایش فشار خون ریوی ناشی از مشکلات سمت راست قلب، افزایش فشار پورت و در برخی موارد ناشی از سیروز کبد نیز است. در بیماران، گوشه افزایش فشار پورت و در موارد کمی هم سیروز کبدی مشاهده شده است، که این امر می‌تواند یکی از دلایل افزایش فشار خون ریوی باشد. بیمارانی که اسپلنکتومی شده‌اند، احتمال بیشتری دارند تا به سیروز کبدی مبتلا شده و همچنین احتمال افزایش فشار خون ریوی در آنها بیشتر است. در این بیماران همچنین افزایش فعالیت آنزیم ACE نیز مشاهده شده است.

علاوه بر این موارد، بیماری گوشه عوارض بالینی وسیعی دارد که یکی از این عوارض مشکلات خونی است. کم خونی، کاهش پلاکت‌ها و به طور کلی سیتوپنی که در گوشه وجود دارد می‌تواند یک عامل دیگر در افزایش ACE باشد؛ زیرا تاثیرات این

محدود بودن مطالعات غربالگری و انجام آزمایش‌های تشخیص این دسته از بیماری‌ها در ایران، مطالعه حاضر در نظر دارد به عنوان بخشی از طرح جامع روش‌های غربالگری سنجش آنزیمی جدید و رایج در دنیا و روش‌های تشخیص ژنتیکی این بیماری‌ها را در کشور ایران در جهت تشخیص گلیکواسفنگولیپیدوزها طراحی و اجراء کند و استانداردهای نظام تشخیص آزمایشگاهی این بیماری‌ها را معلوم و آن را به نظام سلامت برای ادغام ارائه کند. در گذشته روش استاندارد تشخیص بیماری بر اساس سنجش فعالیت آنزیم β -گلوکوسربروزیداز در لکوسیت‌ها و سلول‌های فیبروبلاست یا سرم و ادرار بیماران و همچنین مشاهده سلول‌های گوشه در نمونه‌های بافتی طحال، کبد و مغزاستخوان بیماران بود. امروزه دیگر نیازی به بیوپسی نیست و به جای آن از روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی برای تشخیص استفاده می‌شود. یکی از حساس‌ترین تست‌ها، سنجش فعالیت آنزیم کیتوتیروزیداز است که از حساسیت و اختصاصیت خوبی هم برخوردار است. آنزیم دیگری که در این بیماران افزایش می‌یابد، آنزیم ACE است. مطالعات مختلفی در مورد افزایش فعالیت این آنزیم در جمعیت‌های گوناگون و کشورهای مختلف صورت گرفته است. اولین مطالعه بر روی افزایش فعالیت این آنزیم در بیماران گوشه توسط آقای Silverstein et al. صورت گرفت که نشان داد، فعالیت این آنزیم در سرم بیماران گوشه تا سه برابر افراد نرمال افزایش داشت، همچنین در نمونه بافت طحال این افراد نیز افزایش فعالیت آنزیم تا ۹ برابر نسبت به بافت نرمال بود (۱۷). در مطالعه Šumarac و همکارانش که در بیماران صربستانی صورت گرفت، ۴۰ بیمار مورد آزمایش گرفتند که میانگین افزایش فعالیت آنزیم در این بیماران 253 U/L بود (۱۸). Pacheco و همکارانش آنزیم ACE را در بیماران کلمبیایی مورد آزمایش قرار دادند و آن را فاکتور قابل اعتمادی برای پایش درمان دانستند (۱۹) Thomas و همکارانش طی بررسی‌هایشان نشان دادند که در ۹۷ درصد بیماران گوشه فعالیت این آنزیم افزایش دارد و با توجه به اینکه می‌توان این آنزیم را در آزمایشگاه‌های روتین انجام داد و تاثیر آن که درمان بر کاهش فعالیت این آنزیم دارد، آن را فاکتور قابل اعتمادی برای پایش درمان دانستند (۲۰). مطالعه ما شامل بررسی فعالیت آنزیم ACE در ۲۹ بیمار مبتلا به گوشه بود، که این بیماران با بررسی فعالیت آنزیم β -گلوکوسربروزیداز که در خارج از کشور انجام گرفته بود، تایید شده بودند. نمونه‌های سالم هم توسط دیگر همکاران که در این طرح جامع کار می‌کردند، پس از استقرار و استاندارد

برديم كه اين اختلاف بين ژنوتیپهای DD با II است. طبق بررسی های ما بیشترین میانگین فعالیت آنزیم را ژنوتیپ DD و کمترین میانگین فعالیت آنزیم را ژنوتیپ II دارد. میانگین فعالیت آنزیم در ژنوتیپ ID در بین میانگین فعالیت آنزیم دو ژنوتیپ دیگر قرار دارد.

بیماری گوشه شایعترین بیماری ذخیره‌ای لیزوزومی است و با توجه به هزینه بالایی که درمان این بیماری دارد تشخیص صحیح و پایش درمان در این بیماران حایز اهمیت است. ACE یکی از آنزیم‌هایی است که می‌تواند به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی در تشخیص این بیماری نقش داشته باشد. همچنین با توجه به اینکه این آزمایش را می‌توان در آزمایشگاه های روتین هم انجام داد، برای پایش درمان گزینه مناسبی است. از جمله مشکلاتی که در مورد این بیماران در ایران مشاهده کردیم، وجود علائم بالینی و بالا بودن مارکرهاي آن حتی پس از اینکه مدت زیادی درمان شدند، بود. از دلایل عمده این امر، عدم پایش درمان و همچنین عدم پیگیری خود بیماران بود که پس از درمان اولیه و فروکش کردن تظاهرات بالینی به طور خودسر دارو را مصرف نمی‌کردند و یا دیر به پزشک مراجعه می‌کردند. بنابراین وجود مارکر مناسبی که بتواند وضعیت درمان را نشان دهد و در شهرستان‌ها هم قابل انجام باشد، مهم به نظر می‌رسد. ACE این ویژگی را به خصوص به عنوان یک مارکر پایش خوب که قابلیت انجام در آزمایشگاه‌های روتین را داشته باشد، دارد. در ضمن با توجه به نقش این پلی مورفیسیم در فعالیت آنزیم ACE، می‌توان از آن برای افزایش حساسیت تست آنزیمی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

در انتها لازم می‌دانم از همکاران و دوستان عزیزم در بخش سل و تحقیقات ریوی و بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران و همچنین از اساتید و کارشناسان محترم گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و امتنان را داشته باشم.

آنزیم در خون سازی مشاهده شده است. در ضمن با توجه به اینکه ACE در التهاب نیز نقش دارد، وجود التهاب در بیماران گوشه می‌تواند در افزایش فعالیت این آنزیم نقش داشته باشد. با توجه به نتایج حاصله و بالا بودن ۹۷ درصد نتایج برای تعیین یک cut off مناسب که در آن حساسیت و ویژگی در بالاترین حد باشد از منحنی راک استفاده کردیم. قبل از استفاده از این منحنی و با توجه به دامنه نرمال کیت حدود ۲۰ درصد نمونه‌های افراد سالم هم بالاتر از حد نرمال بودند. برای رفع این مشکل از منحنی راک استفاده کردیم، نقطه برش مناسبی که برای تست ما به دست آمد در نقطه ۱۰۹U/L بود که پس از تقسیم جمعیت در دو گروه بالای ۱۰۹U/L و پایین ۱۰۹U/L مشاهده شد که کمتر از ۵ درصد جامعه نرمال بالاتر از نقطه برش است؛ بنابراین حساسیت و ویژگی تست ما افزایش می‌یابد. همان طور که ذکر شد، از فعالیت ACE در بیماری گوشه می‌توان به عنوان مارکری برای پایش درمان استفاده کرد. نمونه‌های بیمار ما شامل ۱۱ مورد بیمار جدید (درمان نشده) و ۱۸ مورد بیمارانی بودند که تحت درمان قرار داشتند. میانگین فعالیت آنزیم ACE در بیمارانی که درمان شده بودند برابر ۲۱۱/۹U/L بود که در مقایسه با میانگین فعالیت آنزیم ACE در بیماران جدید که برابر ۲۶۲/۴U/L است، تقریباً ۵۱U/L کمتر است. بررسی پلی مورفیسیم I/D در بیماران گوشه برای اولین بار در این مطالعه انجام شد. البته این پلی مورفیسیم در بیماری‌های دیگری که در آنها افزایش ACE وجود دارد مورد بررسی قرار گرفته است و در بعضی این مطالعات هدف، استفاده از این پلی مورفیسیم به عنوان مارکری برای تشخیص زود هنگام بیماری استفاده شده است. در افزایش فشار خون، آترواسکلروزیس، بیماری‌های کرونری قلب، سکته قلبی، نوروپاتی دیابتی، آلزایمر، عملکرد عضله و طول عمر، نقش این پلی مورفیسیم مشخص شده است. (۲۳-۲۱). نتیجه آزمایشات مولکولی ما در ۲۹ بیمار گوشه شامل ۶ (۲۰/۷) II، ۹ (۳۱) DD و ۱۴ (۴۸/۳) ID بود. بین ژنوتیپ‌های حاصل و میزان فعالیت آنزیم ارتباط وجود داشت، به عبارت دیگر اختلاف بین میانگین فعالیت آنزیم در این سه گروه ژنوتیپی معنی‌دار بود. با استفاده از آزمون توکی که میانگین‌ها را با هم مقایسه می‌کرد، پی

REFERENCES

1. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Human Mut* 2008;29:567-83.
2. Rodríguez-Mari A, Díaz-Font A, Chabás A, Pastores GM, Grinberg D, Vilageliu Ls. New insights into the origin of the Gaucher disease-causing mutation N370S: extended haplotype analysis using the 5GC3. 2, 5470 G/A, and ITG6. 2 polymorphisms. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:950-9.

3. Rosenbloom BE, Weinreb NJ. Gaucher disease: a comprehensive review. *Crit Rev Oncog* 2013;18:10-13.
4. Mistry PK, Lopez G, Schiffmann R, Barton NW, Weinreb NJ, Sidransky E. Gaucher disease: Progress and ongoing challenges. *Mol Genet Metab* 2017;120:8-21.
5. Amaral O, Lacerda L, Santos R, Pinto R, Aerts H, Miranda MS. Type 1 Gaucher disease: molecular, biochemical, and clinical characterization of patients from northern Portugal. *Biochem Med Metab Biol* 1993;49:97-107.
6. Orvisky E, Park JK, LaMarca ME, Ginns EI, Martin BM, Tayebi N, et al. Glucosylsphingosine accumulation in tissues from patients with Gaucher disease: correlation with phenotype and genotype. *Mol Genet Metab* 2002;76:262-70.
7. Pattanashetti MA, Chavan RY. Type I (Non-neuronopathic) Gaucher's disease with bone marrow involvement: a rare case report. *Arch Pathol Lab Med* 2016;3:C228-32.
8. Cox T, Lachmann R, Hollak C, Aerts J, van Weely S, Hrebíček M, et al. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *Lancet* 2000;355:1481-5.
9. Sale SM, Mane VP, Pawar VR, Mohite SN, Dhaka V. Clinical correlation of pancytopenia with bone marrow study in a tertiary hospital. *Indian J Pathol Oncol* 2016;3:247-54.
10. Motlagh B, Taghikhani M, Khatami S, Zamanfar D. Allelic Frequency of a 24-bp Duplication in Exon 10 of the CHIT1 Gene in the General Iranian Population. *Gen Test Mol Biomark* 2016;20:31-6.
11. Regenboog M, van Kuilenburg AB, Verheij J, Swinkels DW, Hollak CE. Hyperferritinemia and iron metabolism in Gaucher disease: Potential pathophysiological implications. *Blood Rev* 2016;30:431-7.
12. Ehlers MR, Riordan JF. Angiotensin-converting enzyme: zinc-and inhibitor-binding stoichiometries of the somatic and testis isozymes. *Biochemistry* 1991;30:7118-26.
13. Rodgers K, Xiong S. Effect of angiotensin II and angiotensin (1-7) on hematopoietic recovery after intravenous chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;51:97-106.
14. Ehlers M, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:7741-5.
15. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou J-P, Arveiler D, et al. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992;359:641-4.
16. Rahimi Z, Felehgari V, Rahimi M, Mozafari H, Yari K, Vaisi-Raygani A, et al. The frequency of factor V Leiden mutation, ACE gene polymorphism, serum ACE activity and response to ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist drugs in Iranians type II diabetic patients with microalbuminuria. *Mol Cell Biol* 2011;38:2117-23.
17. Silverstein E, Friedland J. Elevated serum and spleen angiotensin converting enzyme and serum lysozyme in Gaucher's disease. *Clinica Chimica Acta* 1977;74:21-5.
18. Sumarac Z, Suvajdžić N, Ignjatović S, Majkić-Singh N, Janić D, Petakov M, Dorđević M, Mitrović M, Dajak M, Golubović M, Rodić P. Biomarkers in Serbian patients with Gaucher disease. *Clin Biochem* 2011;44:950-4.
19. Natesh R, Schwager SL, Sturrock ED, Acharya KR. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* 2003;421:551-4.
20. Thomas A, Mehta A, Hughes D. Diagnosing Gaucher disease: an on-going need for increased awareness amongst haematologists. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50:212-7.
21. Kario K, Hoshida S, Umeda Y, Sato Y, Ikeda U, Nishiuma S, et al. Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives. *Hypertens Res* 1999;22:95-103.
22. Ojha S, Haritwal A, Meenai FJ, Gupta S. Bone marrow examination findings in cases of pancytopenia-a study from central India. *Indian J Pathol Oncol* 2016;3:479-84.
23. Schachter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, et al. Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nature Gen* 1994;6:29-32.