Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Pyruvate kinase deficiency and its gene mutations in newborns with jaundice in East Azerbaijan province year 2014

Zeinab Gholami[1], Abbasali Hossein Pourfeizi[2*], Majid Mahallei[3], Majid Farshdousti Hagh[2], Aliakbar Movassagpour Akbari[2]

[1]Department of Immunology, School of Medicine, Stem Cells Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Department of Pediatric, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
*Corresponding author; E-mail: pourfeizi@yahoo.com, pourfeizi@tbzmed.ac.ir

Received: 7 March 2017 Accepted: 18 June 2017 First Published online: 5 March 2019
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 April-May; 41(1):65-71

Abstract

Background: Jaundice is a relatively common finding in newborns and deficiency of pyruvate kinase (PK) in Emden Meyerhoff pathway of glycolysis in Erythrocytes can be one of the etiologic factors in its pathogenesis. It is responsible for hereditary non-spherocytic hemolytic anemia. In this study the prevalence of PK deficiency was determined in newborns with jaundice in East Azerbaijan province, Iran.

Methods: In a five month period in 2014, among all the newborns admitted to the neonatal ward of Children's Hospital of Tabriz Medical University, those with non-conjugated hyperbilirubinemia were included in this study. Routine Lab. results were collected from hospital records. PK activity was determined by Coupled Enzyme Assay by using ELISA technique. Pyruvate kinase normal range was determined in 30 umbilical cord blood samples of healthy normal newborns. A reduction more than 60% of the mean normal value labeled as deficiency. Common PK-LR gene mutations were studied by PCR-RFLP method

Results: Two hundred neonates with indirect hyperbillirubinemia, out of a total 1750 admitted newborns were included. Lab. normal mean and range of PK activities were detected as 4.1 and 3.52-8.45 mili-unit/ml (mU/ml) respectively. In 32 out of 200 (16%) of jaundiced neonates, a decrease in PK activity was detected (mean 1.98± 0.24mU/ ml).Meanwhile only 4 out of 200 neonates (2%) were G6PD deficient. Sixteen out of 32 PK deficient patients (50%) were heterozygous for G1529A PK-LR gene mutation, while the G1168A mutation was not detected in our patients.

Conclusion: A relatively high prevalence of PK deficiency was found in our newborns with jaundice in East Azerbaijan province, Iran. So PK deficiency should be considered in the differential diagnosis of newborns with jaundice. Further detailed molecular studies are recommended.

Keyword: Neonatal jaundice, Pyruvate Kinase deficiency, Mutations, East Azerbaijan province.

How to cite this article: Gholami Z, Hossein Pourfeizi A, Mahallei M, Farshdousti Hagh M, Movassagpour Akbari A. [Pyruvate Kinase deficiency and its gene mutations in newborns with jaundice in East Azerbaijan province year 2014]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 April-May;41(1):65-71. Persian.

© 2019 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

کمبود آنزیم پیروات کیناز و جهش‌های شایع در ژن آن در نوزادان مبتلا به زردی دوره نوزادی در استان آذربایجان شرقی در سال ۱۳۹۳

زینب غلامی[۱]، عباسعلی حسین پورفیضی[۲*]، مجید محله ای[۳]، مجید فرش دوستی حق[۲]، علی اکبر موثق پور اکبری[۲]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و علوم انتقال خون، گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولهای بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳]گروه کودکان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[*]نویسنده مسئول؛ ایمیل pourfeizi@yahoo.com و pourfeizi@tbzmed.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۸ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۱۲/۱۴
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸؛ ۴۱(۱):۶۵-۷۱

چکیده

زمینه: زردی یکی از یافته‌های شایع در دوره نوزادی است و کمبود آنزیم پیروات کیناز در مسیر امبدن میرهوف گلیکولیزدر اریتروسیت‌ها می‌تواند یکی از دلایل آن باشد. این کمبود، مسئول ایجاد آنمی همولیتیک غیراسفروسیتیک ارثی می‌باشد. در این مطالعه بررسی فراوانی کمبود آنزیم پیروات کیناز در نوزادان مبتلا به زردی استان آذربایجان شرقی برای اولین بار انجام گرفت.

روش‌کار: در یک بازه زمانی پنج ماهه از میان ۱۷۵۰ نوزاد بستری شده در بخش نوزادان بیمارستان کودکان، ۲۰۰ نوزاد با هیپر بیلی‌روبینمی غیرگونژوگه برای بررسی فعالیت آنزیم پیروات کیناز انتخاب شدند. داده‌های آزمایشگاهی و بالینی بیماران از پرونده بیماران جمع‌آوری گردید. ابتدا فعالیت آنزیم پیروات کیناز توسط روش جفت آنزیمی و سپس فراوانی دو جهش شایع G1168A و G1529A به روش PCR-RFLP مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: ابتدا میزان فعالیت آنزیم پیروات کیناز در ۳۰ نمونه خون بند ناف نرمال اندازه گیری و دامنه‌ی آن ۸/۴۵-۳/۵۲ mU مشخص گردید. کاهش بیش از ۶۰ درصد از میانگین محدوده نرمال آنزیم، کمبود تلقی گردید. در ۳۲ نوزاد مبتلا به زردی، کمبود فعالیت آنزیم پیروات کیناز مشاهده شد (۱۶٪)، درحالیکه در ۴ نوزاد (۲٪) کمبود آنزیم G6PD وجود داشت.۱۶ نفر از ۳۲ بیمار نسبت به جهش G1529A هتروزیگوت بودند و این در حالی بود که جهش G1168A در هیچ کدام یک از بیماران شناسایی نگردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، شیوع نسبتا بالایی از کمبود پیروات کیناز در نوزادن ایکتریک در استان آذربایجان شرقی نشان داده شد. بنابراین کمبود این آنزیم باید به عنوان یک تشخیص اصلی در بررسی نوزادان با زردی در نظر گرفته شود. مطالعات مولکولی بیشتری در جمعیت این منطقه پیشنهاد می‌گردد.

کلید واژه‌ها: زردی نوزادی، کمبود آنزیم پیروات کیناز، موتاسیون ژنی ، استان آذربایجان شرقی.

نحوه استناد به این مقاله: غلامی ز، حسین‌پور فیضی ع، محله ای م، فرش دوستی حق م، موثق پور اکبری ع ا. کمبود آنزیم پیروات کیناز و جهش‌های شایع در ژن آن در نوزادان مبتلا به زردی دوره نوزادی در استان آذربایجان شرقی در سال ۱۳۹۳. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۱): ۶۵-۷۱

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

وجود زردی یکی از مشکلات شایع دوره نوزادی است که سبب بستری شدن نوزادان در بیمارستان طی ۲ هفته اول زندگیشان می‌گردد (۱). عوامل ایجاد کننده زردی دوره نوزادی متعدد می‌باشند که اختلالات آنزیمی گلبول قرمز یکی از این عوامل دخیل می‌باشند (۲). کمبود آنزیم پیروات کیناز یکی از شایعترین اختلالات آنزیمی در مسیر امبدن میرهوف از گلیکولیز در انسان بوده که همراه با نقص آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز از عوامل اصلی ایجاد کننده آنمی همولیتیک غیراسفروسیتی ارثی می‌باشند (۴-۳). کمبود پیروات کیناز به صورت اتوزومال مغلوب به ارث می‌رسد و اولین بار توسط والتین و همکاران در سال ۱۹۶۱ شناسایی گردید. علائم بالینی در بیماران هموزیگوت و یا هتروزیگوتهای ترکیبی برای دو آلل جهش یافته بروز می‌یابد و معمولا زمانی مشاهده می‌شود که میزان فعالیت آنزیم پیروات کیناز ۶۰ درصد نسبت به فعالیت نرمال آن در افراد سالم کاهش می‌یابد (۵). در این بیماری شدت همولیز متغیر بوده و از دامنه بسیار ملایم و جبران‌پذیر تا آنمی‌های شدید و تهدید کننده زندگی در دوره نوزادی و زردی‌های مستلزم تعویض خون و تزریقات خون متناوب، متفاوت می‌باشند (۵-۳). این تفاوت در علائم بالینی به نوع نقص مولکولی ایجاد شده بستگی دارد. آنمی در نوزادان با افزایش سن تمایل به بهبودی دارد، در حالیکه در بزرگسالان همولیز همواره وجود داشته و گاهی در طی عفونتهای حاد و بارداری شدت همولیز و کم‌خونی افزایش می‌یابد (۶). سایر علائم بالینی شامل زردی، بزرگی طحال و سنگ کیسه صفرا می‌باشند (۷). گرانباری آهن در بیمارانی که تزریقات خونی متعدد داشته‌اند گزارش شده است که استفاده از شلاتورهای آهن در این بیماران ضروری می‌باشد (۸). پیروات کیناز اریتروئیدی آخرین مرحله از مسیر گلیکولیز را کاتالیز می‌کند و عملکرد اصلی آن در اریتروسیتها کاتالیز تشکیل پیروات و آدنوزین تری فسفات از فسفوانول پیروات و آدنوزین دی فسفات می‌باشد (۹). آنزیم پیروات کیناز دارای چهار ایزوفرم می‌باشد و اریتروسیتها حاوی ایزوآنزیم اریتروئیدی هستند (۴-۳). ایزوفرمهای اریتروئیدی و کبدی در ایجاد آنمی همولیتیک غیراسفروسیتی مزمن دخیل هستند و جهش در آنها سبب نقص یا کاهش در عملکرد آنزیم پیروات کیناز می‌گردد (۱۱-۱۰). ژن پیروات کیناز روی کروموزوم شماره ۱ قرار دارد و طول cDNA آن ۲۰۶۰ باز می‌باشد (۱۱). این ژن حاوی ۱۲ اگزون می‌باشد که ۱۰ اگزون آن بین ۲ ایزوآنزیم مشابه و اگزون ۱ و ۲ به ترتیب اختصاصی رده اریتروئیدی و کبدی می‌باشد (۱۲). آنزیم پیروات کیناز ۵۷۴ اسیدآمینه داشته و دارای ساختمان هموتترامری می‌باشد که علاوه بر کنترل تغییرات متابولیک در مسیر گلیکولیز در متابولیسم سلولی نیز نقش ضروری و حیاتی دارد (۷). بیش از ۳۰۰ جهش مختلف در ژن پیروات کیناز شناسایی شده‌اند که اکثرا شامل جهش‌های نقطه‌ای و جابجایی می‌باشند (۶). فراوانی کمبود آنزیم پیروات کیناز و طیف جهش های موجود در آن در گروههای نژادی مختلف در مناطق جغرافیایی متعدد بررسی و شناسایی شده است (۱۴-۱۳). در یک مطالعه صورت گرفته در استان فارس فراوانی نقص آنزیم پیروات کیناز و انواع جهش‌های موجود در ژن پیروات کیناز در نوزادان مبتلا به زردی مورد بررسی قرار گرفته و شیوع کمبود پیروات کیناز ۱۰/۴۸ درصد گزارش گردیده است (۱۵). در این مطالعه فراوانی کمبود آنزیم پیروات کیناز و جهش‌های شایع در ژن آن در نوزادان مبتلا به زردی در استان آذربایجان شرقی مورد مطالعه قرار گرفت تا در صورت وجود نرخ افزایش یافته از بروز بیماری بیانگر این مطلب خواهد بود که علاوه بر بررسی نقص گلوگز ۶- فسفات دهیدروژناز، کمبود پیروات کیناز نیز باید به عنوان یک علت جداگانه در نوزادان ایکتریک در نظر گرفته شود.

روش‌کار

در یک دوره پنج ماهه از میان کلیه نوزادان بستری شده در بیمارستان کودکان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تبریز، همه نوزادان ترم ایکتریک با مقادیر بیلی‌روبین توتال بالای ۱۷g/dl جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند. حجم نمونه براساس مطالعات صورت پذیرفته و روشهای آماری تعیین حجم جامعه آماری و هم چنین براساس میزان مراجعه‌کنندگان به مراکز درمانی تعیین گردید. معیارهای خروج از مطالعه شامل وجود کلستاز، هموگلوبینوپاتی‌ها، پلی‌سایتمی، ترومای حین زایمان، ناسازگاری گروههای خونی از نظر ABO و Rh و نارسی و کم وزن بودن نوزاد بود. در هیچ یک از نوزادان انتخاب شده تعویض یا تزریق خون صورت نپذیرفته بود و نوزادانی که علت اختصاصی ایکترشان تشخیص داده شده بود از مطالعه کنار گذاشته شدند. میزان بیلی‌روبین توتال و مستقیم و غیرمستقیم، غلظت هموگلوبین، هماتوکریت، شمارش گلبولهای قرمز، تعیین گروه خونی، درصد رتیکولوسیت، و تست کومبس مستقیم با روشهای استاندارد آنالیز و تعیین شده و در پرونده بیماران موجود بودند. بعد از دریافت رضایت آگاهانه از والدین نوزادن، حدود ۳ میلی لیتر خون تام در ویالهای CBC جمع آوری گردید و فعالیت آنزیمی طی ۴۸ ساعت بعد از زمان خونگیری اندازه گیری گردید. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پیروات کیناز توسط کیت اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم (شرکت سیگما آلدریچ، امریکا) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت صورت پذیرفت. غلظت آنزیم براساس روش جفت آنزیمی اندازه‌گیری و نتایج در طول موج ۵۷۰ نانومتر متناسب با میزان پیروات تولیدی توسط دستگاه الایزا ریدر (Lab System Auto LIA II, Finland) خوانده شد. یک واحد از آنزیم پیروات کیناز مقداری از آنزیم می‌باشد که یک گروه فسفات را از فسفوانول پیروات به آدنوزین دی فسفات برای تولید یک

میکرومول پیروات در دقیقه در دمای ۲۵°C انتقال می‌دهد. نتایج در واحد Mili-unit/ml (mU) گزارش گردید. به منظور تعیین محدوده نرمال آنزیم پیروات کیناز برای این نوزادان، ۳۰ نمونه خون بند ناف از نوزادان سالم بدنیا آمده که از نظر بالینی و هماتولوژیک علائمی مبنی بر زردی نوزادی طی ۷۲ ساعت بعد از زمان تولدشان نداشتند، جمع‌آوری و میزان فعالیت آنزیم پیروات کیناز در آنها تعیین گردید. در نهایت محدوده مرجع، میانگین و انحراف معیار محاسبه و تعیین گردیدند. برای بررسی مولکولی ژن پیروات کیناز، ابتدا DNA ژنومیک از لکوسیتهای خون تام بیماران با کمبود آنزیم پیروات کیناز توسط روش استاندارد نمک اشباع جداسازی و استخراج گردید (۱۶). به منظور تعیین فراوانی دو جهش شایع G1168A و G1529A ژن PK-LR به ترتیب دو اگزون ۹ و ۱۱ با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۲۰۰ نانوگرم DNA در ۲۵ میکرومول مخلوط PCR تکثیر یافت. انجام واکنش PCR تحت شرایط زیر صورت گرفت: دناتوراسیون اولیه در ۹۰°C به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ۶۰ ثانیه در ۹۵°C، اتصال ۴۵ ثانیه در ۵۳°C و گسترش ۶۰ ثانیه در ۷۲°C و گسترش نهایی ۴ دقیقه در دمای ۷۲ °C. پرایمرهای استفاده شده برای بررسی جهش‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

اگزون ۹	Reverse: 5'-ggtatggaagggatttggttc-3'	Forward: 5'-ggtccccagtcacagtgtg-3'
اگزون ۱۱	Reverse: 5'-gctcctgatacaaatggtagg-3'	Forward: 5'-cgttcaccactttcttgctg-3'

جهت بررسی جهش‌ها از روش RFLP استفاده گردید. برای هضم محصولات PCR از آنزیم‌های محدودالاثر BsrD1 (ER1261,Thermo Scientific ,USA) و StyI (ER0411, Thermo Scientific, USA) به ترتیب برای جهش های G1168A و G1529A در اگزون‌های ۹ و ۱۱ استفاده گردید. برای تایید ژنوتیپ‌های بدست آمده از روش PCR-RFLP چند نمونه به صورت تصادفی جهت توالی‌یابی DNA ارسال شدند. برای توصیف متغیرها از آمار توصیفی (فراوانی، درصد، میانگین و انحراف معیار) و برای تجزیه و تحلیل یافته‌ها از آزمون استنباطی استفاده شد. بررسی ارتباط میان متغیرها توسط آزمون تفاوت میانگین برای گروه‌های مستقل و آزمون رابطه مجذور کای و مدل رگرسیونی در سطح معنی‌داری برابر ۰/۰۵ با استفاده از نرم افزار SPSS (21) صورت گرفت.

یافته‌ها

از تعداد ۱۷۵۰ نوزاد بستری شده در محدوده زمانی ۵ ماهه، تعداد ۲۰۰ نوزاد وارد مطالعه شدند. ابتدا محدوده نرمال فعالیت آنزیم پیروات کیناز از ۳۰ نمونه خون بند ناف نوزادان سالن غیر همگروه، ۳/۵۲–۸/۴۵mU با میانگین ۶/۰۱ تعیین گردید. کاهش بیش از ۶۰٪ از میانگین محدوده نرمال آنزیم، کمبود تلقی گردید. از ۲۰۰ نوزاد (۵۷/۵٪ نوزاد پسر، ۴۲/۵٪ نوزاد دختر) ۳۲ نفر مبتلا به کاهش در فعالیت آنزیم پیروات کیناز بودند (جدول۲).

جدول ۲: میانگین و انحراف استاندارد (SD ± میانگین) متغیرهای عمومی در افراد مورد مطالعه

متغیر	نوزادان با کمبود پیروات کیناز (n=32)	نوزادان بدون کمبود پیروات کیناز (n=168)
سن (روز)	۷/۶±۲/۲	۸±۳/۱
وزن تولد (گرم)	۳۳۳۰±۴۶۶	۳۱۶۲ ±۴۵۳

جدول ۳ پارامترهای مختلف آزمایشگاهی را در دو گروه نشان می دهد. فعالیت آنزیم پیروات کیناز در گروه بیماران با کمبود پیروات کیناز ۲/۱۹–۱/۳۹ mU بامیانگین ۱/۹۸ mU بود، در حالیکه محدوده‌ی فعالیت آنزیم پیروات کیناز در سایر نوزادان مورد بررسی ۷/۲۳mU–۳/۵۵ با میانگین ۴/۸ mU تعیین گردید (P<۰/۰۵). ۶ مورد از بیماران فعالیت آنزیمی کمتر از ۲ mU را داشتند. در مورد متغیرهای کمی نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پیروات کیناز و بیلی‌روبین توتال وغیر کونژکه بین دو گروه نوزادان با و بدون کمبود پیروات کیناز تفاوت معنی‌داری وجود دارد P <۰/۰۵. در گروه بیماران با کمبود پیروات کیناز ارتباط منفی میان متغیر بیلی روبین توتال و فعالیت آنزیم پیروات کیناز مشاهده گردید.

جدول ۳: پارامترهای آزمایشگاهی در نوزادان با و بدون کمبود پیروات کیناز

متغیر	نوزادان با کمبود پیروات کیناز (n=32)	سایرنوزادان بدون کمبود پیروات کیناز (n=168)	P Value
فعالیت پیروات کیناز*	۱/۹۸±۰/۲۴	۴/۷۸±۰/۹۱	<0.05
بیلی روبین توتال*	۲۱/۸۱±۳/۰۱	۱۹/۵±۲/۹۵	<0.05
بیلی روبین غیرکونژوگه	۲۱/۲۸±۰/۴۹	۱۸/۹۵±۰/۱۲	<0.05
بیلی روبین کونژوگه	۰/۵۱±۰/۱۲	۰/۵۷±۰/۵۷	غیرمعنی دار
هموگلوبین	۱۷/۹۱±۴/۰۱	۱۷/۵±۴	غیرمعنی دار
هماتوکریت	۵۱/۱۲±۵/۵۹	۴۸/۵±۸	غیرمعنی دار
MCV	۱۰۰/۷۴±۶/۴۵	۹۸/۵±۵/۹	غیرمعنی دار
MCH	۳۵/۸±۲/۲۴	۳۴/۹±۲/۴	غیرمعنی دار
شمارش رتیک	۳/۷۹±۱/۰۴	۲/۴±۳/۵۱	غیرمعنی دار

طی مطالعات مولکولی ۶۴ کروموزوم در ۳۲ بیمار با کمبود پیروات کیناز مورد مطالعه قرار گرفت. در نتایج حاصله جهش G1529A در ۱۶ کروموزوم ملاحظه گردید، درحالیکه حضور جهش G1168A شناسایی نشد. نتایج توالی یابی با نتایج حاصل از روش PCR-RFLP منطبق بودند.

بحث

زردی و افزایش بیلی روبین یکی از مشکلات اصلی شایع در دوران نوزادی می‌باشد (۱۷). به طور متوسط در ۶۰٪ نوزادان ترم و ۸۰٪ نوزادان نارس وجود هیپر بیلی‌روبینمی گزارش گردیده است که در اکثر موارد این بیماری خوش‌خیم بوده، اما در موارد شدید و بدون درمان افزایش بیلی‌روبین غیرکونژوگه نوروتوکسیک بوده و خطر بالینی متعاقب آن پیدایش کرنیکتروس ناشی از اثرات سمی بیلی‌روبین روی مغز می‌باشد (۱). بجز نقص گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز و فسفوگلیسرات کیناز که وابسته به کروموزوم X هستند، ۱۲ اختلال آنزیمی گلبولهای قرمز که سبب ایجاد آنمی همولیتیک غیراسفروسیتی ارثی می‌شوند به صورت اتوزومال مغلوب به ارث می‌رسند (۱۸). این نظریه وجود دارد که حدود ۸۰ درصد از آنمی‌های همولیتیک غیراسفروسیتی ارثی به دلیل کمبود آنزیم پیروات کیناز و نقص G6PD ایجاد می‌شود (۱۹-۱۸). اختلال در فعالیت آنزیم پیروات کیناز به صورت ناهنجاریهای متفاوتی در گلبولهای قرمز انسان عرضه می‌شود به صورتی که فعالیت افزایش یافته آن سبب پلی سایتمی و کمبود فعالیت آنزیمی منجر به نقص آنزیم پیروات کیناز و آنمی همولیتیک می‌شود (۱۲). بررسی‌های اپیدمیولوژیک صورت گرفته نشان داده است که فراوانی کمبود پیروات کیناز در آمریکا ۱درصد، آفریقا ۲/۴ درصد و در جمعیت کل افراد سفیدپوست ۱:۲۰۰۰۰۰ می‌باشد (۲۱-۲۰). فراوانی کمبود آنزیم پیروات کیناز در نوزادان کشورهای ژاپن۳ در صد، چین ۳/۴٪ و در نوزادان ایکتریک کشورهای هندوستان ۳/۲۱٪، عربستان ۶٪ و همچنین در بین مردم عادی کشورهای ترکیه ۷/۴٪، آلمان ۱/۴٪ می‌باشد (۲۷-۲۲). در مطالعه‌ای که توسط Yavarian و همکاران در شیراز انجام گرفته است از ۲۱۱ نوزاد با هیپربیلی‌روبینمی ۲۲ نوزاد کاهش در فعالیت آنزیم پیروات کیناز را داشتند (۱۰/۴٪) (۱۵)، در حالیکه در مطالعه حاضر نشان داده شد که ۳۲ بیمار از ۲۰۰ نوزاد (۱۶٪) با هیپربیلی‌روبینمی غیرکونژوگه مبتلا به کمبود پیروات کیناز می‌باشند که این تعداد از نظر فراوانی بیماری در منطقه ما قابل تامل می‌باشد. همچنین در این مطالعه فراوانی کمبود آنزیم G6PD ۲٪ بدست آمد که با گزارش موجود از مطالعه قبلی صورت گرفته در استان آذربایجان‌شرقی (۲/۲۸٪) مطابقت دارد (۲۸). در گروه بیماران با کاهش فعالیت پیروات کیناز میزان بیلی‌روبین توتال افزایش می‌یابد. مطالعات مورفولوژی نیز نشان داد که بیماران با کمبود پیروات کیناز دارای اریتروسیت‌های نرموسیتیک با درجاتی از آنیزوسیتوز و پویئکیلوسیتوز همراه با ماکروسیتوز و پیکنوسیت می‌باشند. در بیماران با کمبود پیروات کیناز توصیف و شناسایی جهش‌های عامل بیماری اهمیت بسزایی دارد و یک توضیح بنیادی از رخداد بیماری را فراهم می‌نماید (۴). در مطالعه حاضر علاوه بر تعیین فراوانی بیماری کمبود پیروات کیناز، ۳۲ بیمار از نظر دو جهش شایع ژن پیروات کیناز که بیماریزایی و شیوع بالای آن‌ها در مطالعات قبلی به اثبات رسیده بود مورد بررسی قرار گرفتند که ۵۰٪ بیماران برای جهش G1529A هتروزیگوت بودند. کمبود پیروات کیناز مرتبط با جهش G1529A باعث کمبود سطح آنزیم R-PK داخل سلولی و متعاقب آن کاهش ATP شده و همولیز رخ می‌دهد (۷-۶). در ۱۶ بیمار هتروزیگوت میانگین فعالیت آنزیم پیروات کیناز ۱/۱۸ mU می‌باشد.در بین بیماران برای دو جهش بررسی شده ژنوتیپ هموزیگوت مشاهده نگردید. در مطالعات انجام یافته در سطوح وسیع‌تر نشان داده شده است که هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن جهش به نوع و موقعیت جهش متاثر کننده ژن پیروات کیناز بستگی دارد و علائم بالینی بیماری در اکثر موارد منعکس کننده ارتباط میان فاکتورهای اکتسابی و ژنتیک تعریف شده بیماری می‌باشد (۳۰-۲۹و۴). مطالعات مولکولی صورت گرفته در سایر کشورها نشان داده است که جهش G1529A شایعترین جهش موجود در سفیدپوستان آمریکا با فراوانی ۴۲٪ و اروپای شمالی و مرکزی از جمله کشورهای فرانسه و آلمان با فراوانی ۴۱٪ می‌باشد (۴و۶). در اروپای جنوبی و مردمان آفریقایی- آمریکایی تبار شایعترین جهشG1456T با فراوانی ۳۲٪ در کشور اسپانیا و ۲۹٪ در کشورهای ایتالیا و پرتغال می‌باشد (۴). در این مناطق جهش G1529A شیوع بسیار نادری دارد. در آسیا شایعترین جهش C1468T می‌باشد (۴و۳۱). در هندوستان شایعترین جهش‌ها G1436A (۱۸/۳۳٪)، G992A (۱۱/۶۶٪) و C1456T با فراوانی ۱۱/۶۶٪ می‌باشند (۳۱). در ترکیه جهش‌های یافت شده C1528A, G1623C, C1456T و C1678G می‌باشند (۳۲). در ایران نیز طی معالعه کوهورت صورت گرفته بین مردم جنوب کشور، شایعترین جهش‌ها G1168A (۱۸٪)،G1529A (۱۶٪) G1492T, G1456T و G1594T (۱۱٪) و جهش G1291A با فراوانی ۱۰٪ گزارش گردیدند (۱۲).

نتیجه‌گیری

امروزه با توجه به افزایش تعداد نوزادان بستری شده در بیمارستانها به دلیل هیپر بیلی‌روبینمی، کاهش روز های بستری بیمارستانی بعد از زایمان، محدودیت‌های پیگیری نوزادان در سطح جامعه بعد از ترخیص، لزوم پیشگیری از کرنیکتروس بعنوان یکی از علل عقب ماندگیهای جسمی – هوشی و افزایش اطلاعات جامعه پزشکی ازنقش آنزیم پیروات کیناز این نتیجه حاصل می‌گردد که علاوه بر بررسی فعلی نقص گلوگز ۶-فسفات دهیدروژناز، کمبود آنزیم پیروات کیناز نیز باید به عنوان یکی از تشخیصهای اصلی برای نوزادان مبتلا به ایکتر در نظر گرفته شده و مورد آزمایش روتین قرار گیرد.. در پایان پیشنهاد می‌شود که این بررسی در بین تعداد بیشتری از نوزادان مبتلا به هیپر بیلی‌روبینمی غیرکونژوگه صورت گرفته و

تعداد بیشتری از جهش‌های موجود در ژن پیروات کیناز نیز در سطح مولکولی مورد بررسی قرار گیرند.

قدردانی

این پژوهش برگرفته از انجام پایان نامه به شماره ۹۲/۲-۴/۲ در دانشگاه علوم پزشکی تبریز می‌باشد. بدین وسیله از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در صدو پنجاه و دومین جلسه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز استان آذربایجان شرقی در تاریخ ۹۲/۱۲/۵ به شماره مرجع ۵/۴/۱۱۰۴۳ به تایید رسیده است.

منافع متقابل

منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

مشارکت مولفان

نویسنده اول ز-غلامی، نویسنده دوم و رابط ع- حسین پورفیضی و سایر همکاران م-محله ای، م-فرش دوستی‌حق و ع- موثق پوراکبری طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشتند و ع-حسین پورفیضی به عنوان نویسنده مسئول، مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده است.

References

1. Ali R, Ahmed S, Qadir M, Ahmad KH. Icterus Neonatorum in Near Term and Term Infants. *SQU Med Journal* 2012; **12**(2): 153-160.
2. Christensen R D, Nussenzveig R H, Yaish H M, Henry E, Eggert L D, Agarwal A M. Causes of hemolysis in neonates with extreme hyperbilirubinemia. *Perinatal Journal* 2014; **34**: 616-619. doi: 10.1038/jp.2014.68.
3. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Roberto Chiarelli L, Valentini G. Pyruvate kinase deficiency: The genotype phenotype association . *Journal of Blood Reviews* 2007; **21**: 217-231. doi: 10.1016 /j.blre.2007.01.001.
4. Zanella A. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Bailliere's Clinical Hematology* 2000; **13**(1): 57-81.
5. Perseu L, Giagu N, Satta S, Sollaino M.C, Congiu R, Galanello R. Red cell pyruvate kinase deficiency in Southern Sardinia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2010; **6**: 280-283.
6. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, Valentini G. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *British Journal of Hematology* 2005; **130**: 11-25. doi: 10/1111/j.1365-2141.2005.05527.X.
7. Zanella A, Bianch P, Fermo E. Pyruvate kinase deficiency. *Hematological /the Hematology Journal* 2007; **92**: 721-723. doi: 10.3324/hae matol.11469.
8. Mojzikova R, Koralkova P, Holub D, Zidova Z, Pospisilova D, Cermak J, et al. Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios. *Br J Haematol* 2014; **165**: 556-563. doi: 10.1111/bjh.12779.
9. Miwa S, Fujii H. Pyruvate Kinase Deficiency. *Journal of Clinical Biochemistry* 1990; **23**: 155-157. doi: 10.1172/JCI117846.
10. Beutler E, Baronciani L. Mutations in Pymvate Kinase. *Journal of Human Mutation* 1996; **7**: 1-6. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004
11. Gupta V, Bamezai R. Human pyruvate kinase M2: A multifunctional protein. *Protein Sciences* 2010; **19**: 2031-2044. doi: 10.1002/pro.505.
12. Yavarian M, Karimi M, Shahriary M, Afrasiabi A R. Prevalence of pyruvate kinase deficiency among the south Iranian population: Quantitative assay and molecular analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2008; **40**: 308-311. doi: 10.1016/j.bcmd.2007.08.008.
13. Pissard S, Max-Audit I, Skopinski L, Vasson A, Vivien P, Bimet C, et al. Pyruvate kinase deficiency in France: a 3- year study reveals 27 new mutations. *British Journal of Haematology* 2006; **133**: 683-689. doi: 10.1111/j.1365-2141. 2006.06076.x.
14. Percy M J, van Wijk R, Haggan S, Savage G A, Boyd K, Dempsey S, et al. Pyruvate kinase deficient hemolytic anemia in the Northern Irish population. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2007; **39**: 189-194. doi: 10.1016/j.bcmd.2007.05.
15. Yavarian M, Shahian M, Karimi M, Rezaie N. Prevalence of Pyruvate Kinase Deficiency among the Newborns (Shiraz-Iran). *Iranian Journal of Blood and Cancer* 2007; **1**(3): 89-93.
16. Miller S A, Dykes D D, Pole sky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998; **16**(3): 12-15.
17. Pissard S, Montalembert M, Bachir D, Max-Audit I, Goossens M, Wajcman H, et al. Pyruvate Kinase

(PK) Deficiency in Newborns: The Pitfalls of Diagnosis. The *Journal of Pediatrics* 2007; **10**(39): 443-445. doi: 10.1016/j.jpeds.2007.01.03 9.
18. Murray N, Roberts I. Haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007; **92**: 83-88. doi: 10.1136/adc.2005.076794.
19. Diez A, Gilsanz F, Martinez J, Perez-Benavente S, Meza N, Bautista J. Life-threatening nonspherocytic hemolytic anemia in a patient with a null mutation in the PKLR gene and no compensatory PKM gene expression. *Blood Journal* 2005; **106**: 1851-1856. doi: 10.1182/ blood-2005-02-0555.
20. Miwa S, Fujii H. Molecular basis of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia. *Am J Hematol* 1996; **51**: 122-132.
21. Beutler E, Gelbart T. Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. *Journal of the American Society of Hematology* 2000; **95**(11): 3585-3588. doi: 10.1007/978-1-4684-2457-73
22. Ishida Y, Miwa S, Fujii H, Fujinami N, Takegawa S, Yamato K. Thirteen cases of pyruvate kinase deficiency found in Japan. *Am J Hematol* 1981; **10**: 239-250. doi: 10.1002/ajh.2830100303
23. Fung R, Keung Y K, Chung.G. Screening of Pyruvate Kinase Deficiency and G6PD Deficiency in Chinese Newborn in Hong Kong. *Arch. Dis. Childh* 1969; **44**: 373-376.
24. Kedar P, Warang P, Colah R, Mohanty D. Red Cell Pyruvate Kinase Deficiency in Neonatal Jaundice Cases in India. *Indian Journal of Pediatrics* 2006; **73**(11): 985-988. doi: 10.1007/ bf02758302
25. Abu-Melha A M, Ahmed M A M, Knox-Macaulay H, Al-Sowayan S A, El-Yahia A. Erythrocyte Pyruvate Kinase Deficiency in Newborns of Eastern Saudi Arabia. *Acta Haematol* 1991; **85**:192-194. doi: 10.1159/00020 4890
26. Akin H, Baykal-Erkilic A, Aksu A, Yucel G, Gumuşlu S. Prevalence of erythrocyte pyruvate kinase deficiency and normal values of enzyme in a Turkish population. *Hum Hered Journal* 1997; **47**(1): 42-46. doi: 10.1159/0002 04890
27. Frequency of glutathione reductase, pyruvate kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiencyin a Spanish population. *Hum. Hered.* 1979; 29: 310–313. doi: 10.1159/000153063
28. Ghorashi Z, Soltani Ahari H, Ghorashi S. Glucose 6 - Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Jaundiced Neonates in Tabriz Children's Hospital. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences* 2003; **29**(3): 89-93. (Persian).
29. Zanella A, Bianchi P, Baronciani L, Zappa M, Bredi E, Vercellati C, et al. Molecular Characterization of PK-LR Gene in Pyruvate Kinase Deficient Italian Patients. *Blood Journal* 1997; **89**: 3847-3852. doi: 10.1046/j.1365-2141 .2001.02711.x
30. Keitt A. Pyruvate Kinase Deficiency and Related Disorders of Red Cell Glycolysis. *American Journal of Medicine* 1966; **41**:1-24. doi: 10.1016/0002-9343(66)90036-2
31. Warang P, Kedar P, Ghosh K, Colah R. Molecular and clinical heterogeneity in pyruvate kinase deficiency in India. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2013; **4C**:1-5. doi: 10.1016/j. bcmd.2013.05.006.
32. Sule U, Fatma G. Molecular Analyses of Pyruvate Kinase Deficient Turkish Patients from a Single Center. *Pediatric Hematology and Oncology* 2015; **32**: 354-361. doi: 10.3109/08880018 .2015.1010671