بررسی آنزیم گلوکزشش فسفات دهید روژناز (G-6- PD) در دونورهای حرفه‌ای شهر تهران

دکتر شموئیل رهبر * دکتر ماهرو میراحمدیان *
دکتر پرویز بهادری * دکتر فروزنده برلیان **

خلاصه :

جهت بررسی وتعیین میزان فعالیت آنزیم G-6-PD در ۷۳۸ نفر خون‌دهندگان که به‌بخش انتقال خون بیمارستان رازی مراجعه نموده‌اند اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فوق با دو روش مورد مطالعه قرار گرفت .

۱ــ روش کیفی[1] بطور فلورسنت نقطه‌ای .

۲ــ روش کمی[2] با متد اسپکتروفتومتری U. V.

از تعداد کل ۷۳۸ نفر دونورهای حرفه‌ای، ۲۰ نفر بکلی فاقد فعالیت آنزیم G_6_PD بودند و در ۵ نفر فعالیت آنزیم از حد طبیعی کمتر و ۷۱۳ نفر بقیه فعالیت آنزیمی طبیعی داشتند که بر طبق بررسی‌های انجام شده تعداد قابل ملاحظه‌ای از دهندگان خون به‌نقصان فعالیت آنزیم مذکور مبتلا میباشند . بنابراین پیشنهاد میگردد که از کلیه خون دهندگان آزمایش تعیین فعالیت آنزیم G_6_PD بعمل آیدوچنانچه فاقد فعالیت این آنزیم باشند از انتقال خون این افراد به بیماران مبتلا به‌فاویسم‌حتی ــ الامکان خودداری گردد .

مقدمه :

نقصان فعالیت آنزیم گلوکز شش فسفات دهید روژناز در گلبولهای قرمز به مقیاس زیادی در نواحی مختلف دنیا پراکنده میباشد .

تعداد بیشماری از موارد کم‌خونی‌های همولتیك‌که در اثر داروها و مواد اکسید کننده بوجود میآید نظیر فاویسم و نیز برخی از کم‌خونی‌های همولتیك‌نوزادان و همچنین عده‌ای از کم‌خونی‌های همولیزیائی غیر اسفروسیتی مزمن را مربوط به‌نقصان

* گروه بیولوژی کاربردی مرکز علوم پایه پزشکی دانشگاه تهران
** انتقال خون‌مرکز پزشکی رازی

۱ــ Qualitative
۲ــ Quantatative

فعالیت آنزیم گلوکز شش فسفات دهیدروژناز میدانند (۱۵) .

نخستین گزارش مربوط به‌پیدایش کم‌خونی همولتیك ناشی از تجویز داروی پاماکین در مبتلایان به مالاریا در سال ۱۹۲۶ توسط کوردز[1] انتشار یافت و پس از آن حساسیت به‌داروها و مواد مختلفی که سبب همولیز میگردند مورد مطالعه قرار گرفت . در سال ۱۹۵٤ استعداد داشتن بیماری همولتیك را مربوط به‌یك عیب داخل گلبول‌قرمز دانسته‌اند (٦) .

طبیعت این عامل داخلی واین نقص بوسیله تزریق گلبول قرمز نشاندار شده با Cr_{51} از اشخاص با آنزیم طبیعی به‌بیمارانی که استعداد ابتلا به‌بیماری همولتیك را در اثر حساسیت به‌پریماکین داشته‌اند نشان داده شده است و نیز عکس این عمل، یعنی تزریق گلبول قرمز نشاندار(Cr_{51})از اشخاص حساس به‌پریماکین به افراد سالم انجام گرفته و سپس گیرندگان اریتروسیتهای نشاندار یك دوز درمانی پریماکین دریافت داشته‌اند . افراد حساس به‌پریماکین پس از مصرف آن دچار یك همولیز حاد بوسیله گلبول‌های قرمز خود گردیدند، همچنین ملاحظه گردید که اریتروسیت‌های طبیعی نشاندار شده دراشخاص حساس به‌پریماکین دارای طول عمر طبیعی بوده‌اند، ولی اریتروسیتهای‌حساس به‌پریماکین نزد اشخاص سالم دوران عمرشان کوتاهترمیباشد.(٤)

در سال ۱۹۵٦ نیزکارسون (٥) پریماکین را بعنوان تولید کننده کم‌خونی همولتیك همراه با نقصان آنزیم G_6_PD در گلبولهای قرمز معرفی و ثابت‌نمود .

آنزیمG_6_PD در متابولیسم مواد قندی شرکت داشته وسبب تبدیل‌گلوتاتیون اکسید شد (GSSG) به گلوتاتیون احیا (GSH) میشود. بنظر میرسد گلوتاتیون احیا شده برای بقای گروه سولفیدریل در جدار گلبول قرمز ودر سطح آن ضروری است . گلوتاتیون احیا شده همچنین احتمالا رل مهمی را در کاتوبولیسم هیدروژن پراکسید در داخل گلبول قرمز دارد (۱۵) .

تحقیقات درباره آنزیم G_6_PD دراجتماعات مختلفه انسانی نشان داده است که واریانتهای ژنتیکی زیادی از این آنزیم وجود دارد، بطوریکه، بطوریکه تا بحال در حدود ٥۰ واریانت آنرا شرح داده‌اند که از نظر اختصاصات الکتروفوزی وبیو ـ شیمیائی با آنزیم طبیعی فرق دارد . در بعضی از واریانتها فعالیت آنزیم طبیعی میباشد، برای مثال، برای مثال واریانت A^+ در سیاه‌پوستان (۳) را میتوان نام برد که عاری از تظاهرات کلینیکی میباشد. گروهی دیگر از واریانتها کمبود فعالیت آنزیمG_6_PG داشته وافراد این دسته براثر مصرف بعضی از داروها و مواد مختلفه نظیر باقلاوهمچنین برخی از عفونتها، بخصوص عفونت‌های ویرال مبتلا به عارضه همولیز میگردند برای مثال واریانت A^- در سیاه پوستان (۲۰) ونوع مدیترانه‌اب (۱۳) را میتوان نام برد و بالاخره دسته سوم واریانت‌هائی با آنزیم ناپایدار وجود دارد که حتی بدون‌عامل‌خارجی دچار عارضه همولتیك مزمن میگردند نظیر G_6_PD نوع اوکلاهما (۱۱) وشیکاگو (۱۲) در افراد این گروه همولیز حتی بدون مصرف دارونیز عارض میگردد .

همانگونه که موتاسیون‌های مختلفه سبب پیدایش هموگلوبین‌های غیر طبیعی

1_ Cordss

1_ Fava _ beans

با تظاهرات کلینیکی متغیر میگردد تیپ‌های مختلفه آنزیم G_6_PD نیز با تظاهرات متفاوت وجود دارد .

اغلب واریانت‌های G_6_PD نادرند، ولی بطور معمول بعضی از آنها در اجتماعاتی که ژن هموگلوبین‌های S, E وتالاسمی وجود دارند دیده میشود درایران نیز همانند سایر نقاط دنیا هموگلوبینوپاتیها (۱۷) و نیز کمبود فعالیت آنزیم G_6_PD شایع است بدین منظور مطالعاتی برروی تعدادی از دونورهای حرفه‌ای مرکز انتقال خون بیمارستان رازی انجام دادیم که نتایج آن ذیلا شرح داده میشود :

نمونه‌برداری وروش آزمایش :

جهت بررسی فعالیت‌آنزیم G_6_PD ازتعدادی‌دونورهای‌حرفه‌ای(دونورهای حرفه‌ای افرادی هستندکه بطور متوسط ۷ تا ۱۰ روز یکبار برای‌خون دادن به‌یکی از مراکز انتقال خون در تهران مراجعه و خون میدهند) مرکز پزشکی رازی خون‌گیری بعمل‌آمد . نمونه‌ها برروی ماده ضد انعقاد نیترات‌دوسودگرفته شد . بعداز نمونه‌برداری از تمام خونها ابتدا آزمایش اسکرین[1] بروش فلورسنت نقطه‌ای که توسط بوتلر[2] (۱) معرفی‌گردیده است بعمل آمد . ضمناً جهت صحت آزمایش فوق روش نامبرده قبلا در آزمایشگاه ایمونو شیمی با روش‌های مختلفه نظیر بریان‌کرزیل‌بلو[3] و متهوگلوبین ریدکشن تست[4] مقایسه‌گردید و مشخص شدکه روش فلورسنت متدی بسیار مطمئن و ساده میباشد .

اصول آزمایش فلورسنت نقطه‌ای عبارت است از تشکیل $NADPH_2$ (نیکوتین، آمید آدنین‌دی نوکلئوتید فسفات احیاء شده) در حین فعالیت آنزیم G_6_PD میباشد . $NADPH_2$ درزیر چراغ اولتراویوله‌بشدت فلورسانس نشان‌میدهدهرگاه‌آنزیم G_6_PD فعالیت داشته باشد NADP (نیکوتین آمید آدنین‌دی کلئوتید فسفات) که در محلول آزمایش وجود دارد به $NADPH_2$ تبدیل میشود که ماده فلورسانس قوی میباشد و در تحت اشعه اولتراویوله نقاط فلورسانس را بوضوح میتوان مشاهده نمود ، بنابراین عدم‌فلورسانس دلیل فعال نبودن آنزیم گلوکز شش فسفات دهیدرژنازمیباشد . چون میزان قدرت نقاط فلورسانس بستگی به‌فعالیت آنزیم دارد لذا از خون‌هائی که فلورسانس ضعیف داشتند و همچنین آنهائی که هیچگونه فلورسانسی نشان ندادند و نیز تعدادی از نمونه‌های با فلورسانس طبیعی (معروف فعالیت طبیعی آنزیم میباشد) آزمایش کمی بروش اسپکتروفتومتری کیت بهرینگر انجام گردید و در نتیجه مقدار فعالیت آنزیم در طول موج ۳۶۶ میلی مو اندازه‌گیری شد . آزمایش براین مبناست که آنزیم G_7_PD باعث تبدیل NADP به $NADPH_2$ میگردد ماده اخیر یعنی $NADPH_2$ درطول موج ۳۶۶ میلی مو دارای حداکثر جذب میباشد. بنابراین در مدتی که واکنش انجام می‌شود با تبدیل وازدیاد ماده $NADPH_2$ جذب درطول موج ۳۶۶ بالا میرودومیتوان با محاسبه از روی O. D در این طول موج مقدار فعالیت آنزیم را تعیین نمود .

۱_ Screen Test ۲_ Beutler 3_ Brilliant Cresyle Blue (BCB)
۴_ Methembelobin Reduction Tebt (MRT)

نتایج و بحث :

از تعداد ۷۳۸ نفر از دونورهای حرفه‌ای که به‌بخش انتقال خون مرکز پزشکی رازی مراجعه نموده‌اند آزمایش از نظر تعیین میزان فعالیت آنزیم G_6_PD بعمل‌آمد. از این عده ۲۰ نفر بطور کامل فاقد فعالیت آنزیم G_6_PD بودند وتعداد پنج نفر از حد طبیعی داشتند. که در جدول زیر مشخص گردیده است .

جنس	تعداد	در صد	روش فلورسنت	روش اسپکتروفتومتری (آزمایش کانتیتاتیف
مرد	۲۰	۲/۷۱	ــ	۰
مرد	۵	۰/۶۷	±	۲۳ـ۷۱
مرد	۷۱۳	۹۶/۶۲	+	۲۲ ۱۵۰ـ۲
مجموع	۷۳۸	۱۰۰		

میزان‌طبیعی آنزیم بروش‌اسپکروفتومتری با اریتروسیت ۱۰ /mu ۲۴۰ ــ ۱۲۰می‌باشد.

نقصان فعالیت آنزیم G_6_PD یکی از شایع‌ترین بیماریهای ارثی میباشد و از نظر انتقال ژنتیکی توسط ژنهای واقع در روی کروموزوم جنسی صورت می‌گیرد . در این شکل از انتقال ژنتیکی ژن‌غیرطبیعی در روی کروموزوم X حمل میشود لذا در جنس مذکر X Y همی‌زیکوت[1] است ودر جنس مؤنث هرگاه هر دو کروموزوم X وجود داشته باشد در اینصورت XX هموزیگوت[2] میباشد . و هتروزیگوت X X فقط در زنها دیده میشود (۱۰) . بنابراین مردانی که حامل این ژن میباشند بیماری‌رانشان میدهند ، ولی زنها ممکن است یا حامل ژن بوده و یا بیمار باشند .

گزارشات مربوط به‌نقصان فعالیت آنزیم‌گلوکز شش فسفات دهیدروژنا در گلبول‌های قرمز بمقدار زیاد مابین گروههای نژادی مثل مدیترانه‌ای و سیاه‌پوستان‌دیده شده است. موارد پیدا شده درساکنین کشورهای سواحل مدیترانه و همچنین ساردین ۴۸ ــ ۱۴ درصد(۹) و در بعضی از نقاط یونان بالاتر از ۳۲ درصد در مردان مشاهده شده است (۹) . مطالعاتی که بوسیله گرگ و همکارانش[3] (۹) در جزیره مالت انجام گرفته است نقصان فعالیت آنزیم G_6_PD را در نوزادان پسر ۰/۸٪ گزارش نموده است . امروزه نقصان فعالیت آنزیم G_6_PD را یکی از عوامل هیپربیلروبینمی‌نوزادان میدانند واین بنابر تحقیق بسیاری از دانشمندان در کشورهای مختلف صورت گرفته است (۱۸ و ۱۶ و۸ و ۷) .

۱ــ Hemizygot
۲ــ Homozygot
۳ــ Grech et al

بنابر بررسی‌های انجام شده در یونان موارد پیدایش همولیز ویرقان‌نوزادان بیشتر از ٥ درصد مربوط به‌کمبود آنزیم G_6_PD دانسته‌اند (٨)، ولی بر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی نقصان آنزیم G_6_PD بطورکلی در نقاط مختلف دنیا کمتر از ٣ درصد بوده است (١٣) .

در ایران مطابق پژوهش‌های دکتر نفیسی (٢١) درسال ١٣٤٤، ٦ درصد از ایرانیان به‌کاهش یا فقدان آنزیم G_6_PD در گلبولهای قرمز دچار بوده‌اند همچنین در این مورد مطالعاتی توسط محققین دیگر انجام گرفته که خلاصه آن درجدول زیر مشاهده میگردد (١٤) واریانت‌هائی که در ایران دیده شده هنوز از لحاظ الکتروفرزی مورد مطالعه کامل قرارنگرفته، در چند کار اولیه که‌بوسیله این آزمایشگاه و گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی انجام شده نوع مدیترانه‌ای این آنزیم بیشتر دیده شده است . نتیجه آزمایش الکتروفوزی ودناتوریشین حرارتی این آنزیمها را بزودی‌گزارش خواهیم کرد.

با توجه باینکه هر ساله تعداد زیاد از افرادی که دچار نقصان فعالیت آنزیم G_6_PD هستند با خوردن باقلان تازه مبتلا به سندرم فاویسم میگردند واین بیماری در شمال و جنوب ایران فراوان میباشد و جهت درمان آنان احتمالا از خون‌دونورهای حرفه‌ای از طریق بانکهای خون ترانسفوزیون میگردند که بنابر تحقیقات مندرج در این مقاله تعداد قابل ملاحظه‌ای از آنان دچار نقصان فعالیت آنزیم G_6_PD بوده‌اند لذا پیشنهاد میشود از کلیه‌دهندگان خون آزمایش جهت تعیین فعالیت آنزیم G_6_PD بعمل آید واز خون کسانی که مبتلا به‌نقصان فعالیت آنزیم مذکور میباشند تا آنجا که ممکنست به‌بیماران مبتلا به فاویسم ترانسفوزیون انجام نگردد ضمناً واضح استکه مطالعه دفیشنسی G_6_PD میتواند به حرکت جمعیت‌ها از طریق تعقیب ژن به متخصصین در علم ژنتیك جمعیت کمك فراوان نماید . (٢)

REFERENCES

1. Beutler, E., (A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency). Blood, Vol. 28, No. 4. Page 553, October (1966).
2. Beutler, E., (Screening for glucose 6-Phosphate dehydrogenase deficiency, Israel J. Med. Sci., Vol. 9., No. 9-10, (1973.
3. Boyer, S.H., Porter, I.H. and Weilbacher, RG. Proc. Natl. Acad. Sci. 48:1868, (1962).
4. Brewer, G.J.. Tarlov, A.R. and Kellermeyer, R.W., (Hemolytic effect of primaquine : XII shortened erythrocyte life span in primaquine sensitive male Negroes in the absence of drug administration), J. Lab. Clin. Med. 58 :217, (1961).
5. Carson, P.E., Klanagan, C.L., Ickes, C.E. and Alving, A.S., Science, 124, 484-485, (1956).
6. Dern, R.J., Weinstein, I.M., Le Roy G.V., Talmage, D.W. and Alving, A.S. : (The hemolytic effect of primaquine, I. The localisation of the

drug-induced hemolytic defect in primaquine sensitive individuals). J. Lab. Cli. Med. 43 :303, (1954).

7. Doxiadis, S.A., Fessas, Ph. and Valaes, T., (Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency. A new etiologycal factor, of sever neonatal jaundice). Lancet, 1, 297, (1961).
8. Fessas, Ph., Doxiadis, S.A. and Valaes, T., Neonatal Jaundice in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient infants. British Medical Journal, I, 1359, (1962).
9. Grech, J.L. and Vicatou, M., (Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency in Maltese new-born infants). British Journal of Haematology 25, 261, (1973).
10. Harris, J.W. and Kellermayer R.W. The red cell, ed. by Harvard University Press, P. 567, Cambridge, Massachusette, (1970).
11. Kirkman, H.N. and Riley, R.D., Am. Diseases Children, 102, 213-320, (1961).
12. Kirkman, H.N., Posenthal, I.M., Simon, E.R., Carson, P.E. and Brinson, A.G. J. Lab. Cli. Med. 63, 715-725, (1964).
13. Kirkman, H.N., Schettini, F. and Pickard, B.M., J. Lab. Ulin. Med. 63, 726-735, (1964).
14. Livingston, F.B., (Data on the abnormal Hemoglobins and Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency in human populations, 1967-1973). Museum of Anthropology. The University of Michigan Technical Report, Number 3, ANN ARBOR, (1973).
15. Motulsky, A.G. and Yoshida, A., (Methods for the study of Red cell glucose-6-Phosphate dehydrogenase in : Biochemical Methods in red cell genetics. Ed. by J.J. Yunis, P. 51, Academic Press, New York, (1969).
16. Panizon, F., Erythrocyte enzyme deficiency in unexplained kernicterus. letter) Lancet. II, 1093, (1960).
17. Rahbar, S., Hemoglobinopathis in Iran, XIV International Congress of Hematology Sao Paulo Brasil, July (1972).
18. Weatherall, D.J. (Enzyme deficiency in haemolytic disease of the newborn). Lancet II, 835, (1960).
19. WHO. Technical Report, Series No. 338, (1966).
20. Yoshida, A., Stamatoyannopoulos 6., and Motulsky, A.G., Science, 155, 97-99, (1967).

۲۱ . دکتر رضا نفیسی ــ کتاب بیوشیمی پزشکی چاپ پنجم صفحه ۳۵۱ سال ۱۳۵۲ .

جدول مطالعه نقصان G - 6 - PD در اجتماعات مختلفه ایران (۱۴)

اجتماعات	محل	تعداد	جنس	تعداد مبتلایان به نقصان G-6-PD	درصد مبتلایان به نقصان G-6-PD	تاریخ	نام محقق
قشقائی	شیراز	۱۳۳	مرد	۱۵	۱۱/۳	۱۹۶۳	Bowman, J. E. ,and walker D. G.
زرتشتیان	تهران_یزد	۱۶۴	مرد	۰	۰	»	» » »
مسلمان	تهران	۵۵۷	مرد	۵۵	۹/۹	۱۹۶۹	Hedauyat, Sh. ,Amcrshahy, P. ,et al
مسلمان	تهران	۲۸۸	زن	۲۹	۱۰/۱	»	» » »
کرد	مریوان_بانه	۷۷	مرد	۵	۶/۵	۱۹۷۱	Vergnes, H. , and Gherardi, M. ,
کرد	کردستان	۱۸۴	مرد	۴	۲/۲	۱۹۷۱	Lehman, H. , Pickles, H. , et al.
مسلمان	اصفهان				۹	۱۹۶۷	Beaconsfield, P. , Mahboubi, E. ,

جدول قسمتی از رفرانس شماره ۱۴ استخراج شده است