تشخیص غیر تهاجمی بیماری فنیل‌کتونوری به کمک شبکه عصبی و با استفاده از طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته

فاطمه درستی[۲و۱](M.Sc)، زهرازنگنه[۱](M.Sc)، رقیه میرزازاده[۱](Ph.D)، زهرازمانی[۱](Ph.D)،محمد ارجمند[*۱](Ph.D)، صدیقه صادقی[۱](Ph.D)

۱- *گروه بیوشیمی، انستیتوپاستور تهران، تهران، ایران*

۲- *گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران، تهران، ایزان*

چکیده

سابقه و هدف: بیماری فنیل‌کتونوری یکی از بیماری‌های متابولیسمی نسبتاً شایع در جهان می‌باشد. در کشور ما نیز به‌دلیل ازدواج‌های فامیلی از شیوع بالائی برخوردار است. شیوع این بیماری در ایران از حدود ۱:۴۰۰۰ تا ۱:۸۰۰۰ تولد در هر سال گزارش گردیده است. عقب‌ماندگی‌های ذهنی، ناتوانی‌های جسمی، اختلالات عصبی از جمله عوارض بالینی این بیماری می‌باشند. لذا جهت جلوگیری از بروز این علائم بالینی تشخیص به موقع این بیماری بسیار حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق، استفاده از شبکه عصبی چندلایه پرسپترون (MLP) جهت ساخت مدلی مناسب برای تشخیص سریع بیماران فنیل‌کتونوری از افراد سالم و کمک به درمان به موقع این گروه از بیماران است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، از نمونه ادرار بیماران و کودکان سالم به کمک پروتکل نویزی (NOESY) در دستگاه NMR400 مگاهرتز، طیف سنجی انجام شد. سپس پیک مربوط به هر متابولیت در هر طیف شناسایی گردیده و داده‌های حاصل از این طیف سنجی به‌وسیله شبکه عصبی (MLP) مدل‌سازی و دسته‌بندی و مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها: مدل طراحی شده در این مطالعه، توانست با موفقیت بیش از (۹۰٪<) داده‌های حاصل از طیف سنجی NMR را در دو گروه سالم و بیمار و با قدرت پیش‌بینی بالا از هم تشخیص داده و دسته‌بندی نماید.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده تائید کننده توانمندی و قدرت بالای روش طیف سنجی NMR به همراه مدل سازی شبکه عصبی در زمینه تشخیص و شناسائی بیماری فنیل کتونوری می باشد.

واژه‌های کلیدی: فنیل‌کتونوری، شبکه‌های عصبی، طیف نمایی از طریق تشدید مغناطیسی

مقدمه

بیماری فنیل‌کتونوری یکی از بیماری‌های متابولیسمی شایع در جهان می‌باشد [۱] که به علت کمبود یا اختلال در عمل‌کرد آنزیم فنیل‌آلانین هیدروکسیلاز در کبد، سبب بروز آسیب‌های مغزی غیر قابل برگشت در بیماران فنیل‌کتونوری می‌گردد [۲]. شیوع این بیماری در کشورهای مختلف از ۱:۲۵۰۰ تا ۱:۱۰۰۰۰ تولد متغییر بوده [۳،۲] و در ایران به طور میانگین میزان شیوع آن ۱:۸۰۰۰ تولد گزارش گردیده است [۲]. بیش‌ترین موارد فنیل‌کتونوری در ایران در کودکانی مشاهده شده است که والدین آن‌ها ازدواج خویشاوندی داشته‌اند [۴]. در این بیماری اتوزومی مغلوب، چنان‌چه والدین هر دو حامل ژن بیماری باشند (در ازدواج‌های خویشاوندی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۰۵۳۷۷۶ Email: arjmand1@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۹

این احتمال بالاتر است) احتمال تولد نوزاد مبتلا به بیماری افزایش می‌یابد [۵]. تشخیص زودهنگام و به موقع این بیماری) قبل از دوماهگی یا حداکثر سه ماهگی (جهت جلوگیری از بروز علائم بالینی شدید و غیر قابل جبران و یا کاهش این علائم به‌وسیله رژیم‌های درمانی خاص بسیار حائز اهمیت است [۲].

در حال حاضر در ایران تشخیص این بیماری از طریق سنجش میزان غلظت فنیل‌آلانین در خون بیماران با استفاده از روش‌های گاتری و کراماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام می‌گیرد [۲]. بر اساس گزارش‌ها نتایج حاصل از روش گاتری به دلیل وجود خطاهای مثبت و منفی کاذب بالا به تنهایی قابل قبول نبوده و بایستی این نتایج با یک روش تشخیصی مکمل نیز تایید گردد که معمولاً از روش کراماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاد می‌گردد [۶].

در سال‌های اخیر از روش‌های پیشرفته‌ی اسپکترومتری جرمی، کراماتوگرافی گازی- اسپکترومتری جرمی (GC-MASS)، کراماتوگرافی مایع- اسپکترومتری جرمی (HPLC-MASS) و تکنیک طیف سنجی تشدید مغناطیس هسته‌ای (NMR) جهت غربالگری بیماری‌های متابولیکی استفاده می‌گردد [۳]. از بین روش‌های معرفی شده اسپکترومتری جرمی و طیف سنجی NMR روش‌های متداول‌تری بوده و بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۷،۳]. هر چند روش طیف سنجی NMR در مقایسه با سایر روش‌های پیشرفته انتخابی نبوده و از نظر اقتصادی، مقرون به‌صرفه‌تر و در نتیجه سهل‌الوصول‌تر می‌باشد [۸،۹]. از اواخر سال ۱۹۸۰ میلادی با شناسایی قابلیت‌های بالای شبکه‌های عصبی مصنوعی از جمله تشخیص، شناسایی و امکان پیش‌بینی هم‌زمان بیماری‌ها و طبقه‌بندی انواع داده‌ها، کاربرد این شبکه‌ها در زمینه‌های پزشکی مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است [۱۰-۱۳]. نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ جهت شناسایی انواع بیماری‌های متابولیسمی انجام گرفت نشان می‌دهد که روش NMR دارای توانمندی‌ها و قابلیت‌های بالایی در زمینه شناسایی سریع و آسان بیماری‌های متابولیسمی از جمله فنیل‌کتونوری می‌باشد [۳]. در تحقیق پیش‌رو، برخلاف روش‌های تشخیصی مرسوم که از نمونه سرمی استفاده می‌کنند از نمونه‌های ادرار نوزادان استفاده شد و به دلیل غیر تهاجمی بودن و امکان نمونه‌گیری آسان و راحت، بیش‌تر مورد رضایت و رغبت والدین گروه هدف قرار گرفت. در این مطالعه از روش شبکه عصبی پرسپترون چند (Multi-layer perceptron neural networking) لایه (MLP) جهت مدل‌سازی و افتراق کودکان مبتلا به فنیل‌کتونوری از کودکان سالم و هم‌چنین تهیه یک مدل مناسب جهت پیش‌آگاهی این بیماری در افراد استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما و مرک تهیه گردید و آب سنگین دوتریوم (D_2O) از سازمان انرژی اتمی ایران تهیه شد.

نمونه‌های مورد آزمایش. نمونه‌های ادرار (سالم و بیمار) مورد مطالعه در این بررسی از کودکان رده سنی ۳-۲ ساله جمع‌آوری گردید و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. از ۵۵ کودک مبتلا به بیماری فنیل‌کتونوری که به کلینیک مرکز تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران در تهران مراجعه نمودند، نمونه‌های ادرار جمع‌آوری گردید. بیماری این کودکان قبلاً از طریق روش کراماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد تایید قرار گرفته بود. ۲۵ نمونه ادرار کودکان سالم از همان رده سنی و هم جنس و با رضایت والدین آن‌ها جمع‌آوری گردید.

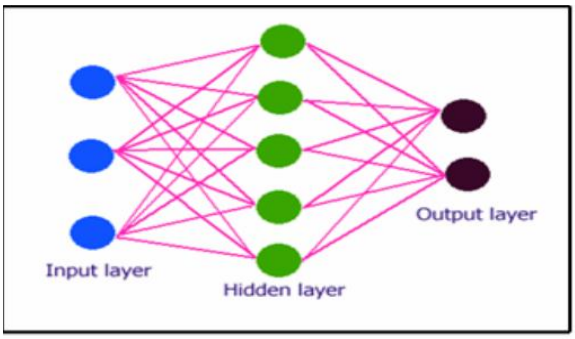
مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها. جهت انجام طیف سنجی ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های ادرار را با ۱۰۰ میکرولیتر محلول یک میلی‌مولار تری‌متیل سایلیل ۲، ۲، ۳، ۳- تترا دوتروپرپیونیک اسید (TSP) در آب دوتره مخلوط نمودیم. محلول TSP به‌عنوان شاهد در طیف سنجی و آب سنگین دوتریوم به عنوان حلال می‌باشند. قبل از آنالیز، pHتمام نمونه‌ها، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمونه‌های ادرار به‌وسیله دستگاه اسپکترومتر رزونانس مغناطیسی هسته (۴۰۰NMR) مگاهرتز

بروکر به کمک پروتکل نویزی (NOESY) طیف سنجی شدند. نمونه‌ها در دمای ۲۹۵ درجه کلوین با تعداد ۱۵۰ اسکن برای هر نمونه و با مدت زمان تاخیری ۶,۵ ثانیه مورد طیف سنجی قرار گرفتند [۱۴]. شدت پیک موجود در جابه‌جایی شیمیایی ۳,۱۳ (پیک مربوط به متابولیت کراتینین) به عنوان غلظت مرجع در نظر گرفته شده و غلظت متابولیت‌های دیگر بر اساس هر میلی‌مول از کراتینین بیان گردیدند.

تبدیل فرمت داده‌ها. با استفاده از کد محاسباتی پرومتب (ProMetab V.1.1)، طیف‌های خام به‌دست آمده از طیف سنجی NMR به فرمت عددی مناسب، جهت آنالیزهای چندمتغیره تبدیل گردیدند [۱۵]. پرومتب ابزاری جهت آنالیز داده‌های حاصل از طیف سنجی NMR می‌باشد که در محیط نرم‌افزار متلب Matlab V. (۲۰۰۹) مورد استفاده قرار می‌گیرد. با استفاده از این کد محاسباتی طیف‌های NMR در جابه‌جایی‌های شیمیایی بین صفر تا ppm ۱۰ به فواصل ppm ۰/۰۰۵ تقسیم شدند. پیک رزونانس آب در محل ppm ۷/۴ حذف گردید.

آزمون آماری داده‌ها. جهت بررسی و مقایسه آماری داده‌ها، از روش آنالیز اجزای اصلی (Principle component analysis) و همچنین شبکه عصبی با ساختار پرسپترون چند لایه استفاده گردید. در ابتدا داده‌های به‌دست آمده بر اساس متد پارتو (Pareto method) نرمالیزه شده و سپس با روش آنالیز اجزای اصلی مورد بررسی قرار گرفت. روش آنالیز اجزای اصلی جهت خوشه‌بندی داده‌ها و همچنین تعیین متابولیت‌های متفاوت در دو گروه مورد استفاده قرار گرفته است. پیک‌های موجود در جابه‌جایی‌های شیمیایی بین ppm ۹-۶ که همگی ترکیبات آروماتیک می‌باشند مورد مطالعه قرار گرفتند.

شبکه عصبی مصنوعی. شبکه‌های عصبی مصنوعی بر اساس ساختار و عملکرد شبکه عصبی موجودات زنده طراحی شده‌اند. طرز کار این شبکه‌ها از روش کار مغز انسان الگوبرداری شده است. این شبکه‌ها از یک سری لایه تشکیل شده‌اند که شامل اجزای ساده‌ای به نام نرون است. ساختار عادی یک شبکه عصبی مصنوعی، متشکل از لایه ورودی، لایه‌های میانی یا پنهان و لایه خروجی است (شکل ۱). لایه ورودی اطلاعات را دریافت کرده و به لایه میانی انتقال می‌دهد. لایه میانی از یک سری نرون‌های پردازشگر تشکیل شده که محل پردازش داده‌ها است و لایه خروجی شامل مقادیر پیش‌بینی شده به‌وسیله شبکه می‌باشد و خروجی‌های مدل را معرفی می‌نماید. تعداد لایه‌ها و نرون‌ها در هر لایه میانی به طور معمول به وسیله روش آزمون و خطا مشخص می‌گردد [۱۶]. یکی از مرسوم‌ترین انواع شبکه‌های عصبی، شبکه عصبی چندلایه پرسپترون (MLP) می‌باشد که به طور موفقیت‌آمیزی در طبقه‌بندی داده‌ها در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این شبکه‌های عصبی توانایی آموزش و یادگیری دارند. آموزش شبکه‌های عصبی در واقع تنظیم وزن‌های ارتباطی این نرون‌ها به ازاء دریافت مثال‌های مختلف می‌باشد تا خروجی‌های شبکه به سمت خروجی‌های مطلوب همگرا شود. پس از آموزش شبکه، بر روی داده‌ها تست صحت (validation) انجام می‌گیرد، یعنی قابلیت شبکه در ارائه خروجی‌های قابل قبول به ازای ورودی‌هایی که در آموزش شبکه شرکت نداشته‌اند سنجیده می‌شود. معمولاً داده‌ها را تا جایی آموزش می‌دهند که خطا بر روی داده‌ها به کم‌ترین مقدار برسد و به محض افزایش مقدار خطا، آموزش را قطع می‌کنند [۱۱].

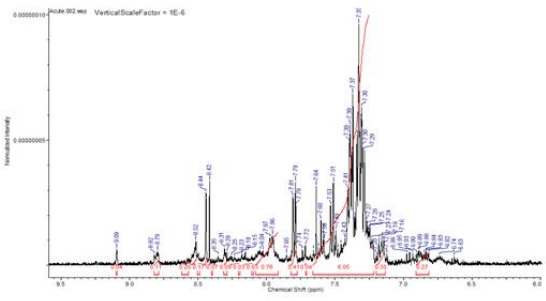


شکل ۱. شبکه عصبی با ساختار سه لایه و ورودی ۸۰ نمونه سالم و بیمار- لایه پنهان ۱۰ نرون و خروجی بیمار و سالم

در این مطالعه از روش شبکه عصبی چندلایه پرسپترون جهت دسته‌بندی داده‌های آموزش داده شده که همان پیک‌های به‌دست آمده در جابه‌جایی‌های شیمیایی (۹ppm–۶) می‌باشند استفاده شد. جهت آموزش شبکه عصبی، از ۸۰ متغیر ورودی (تعداد نمونه کودکان سالم و بیمار)، ۱۰ نرون لایه میانی پنهان و ۲ متغیر خروجی استفاده شده است و فرآیند آموزش به میزان صد بار تکرار گردید. به طور کلی در مرحله آموزش و یا مدل‌سازی از ۷۰٪ نمونه که شامل ۱۷ نمونه کنترل و ۳۹ نمونه بیمار بود استفاده شد و در مرحله تست صحت شبکه با ۳۰٪ باقی‌مانده نمونه‌ها، که شامل ۱۶ بیمار و ۸ نمونه کنترل بود مدل ساخته شده مورد تست صحت و ارزیابی قرار گرفت.

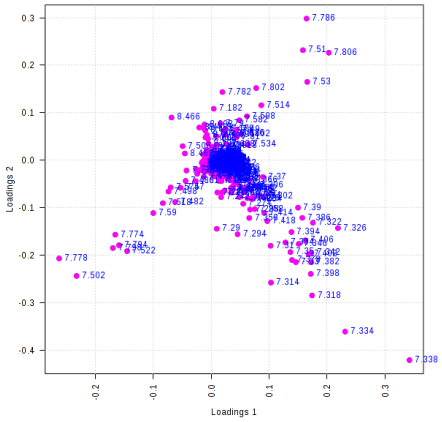
نتایج

نتایج به‌دست آمده با روش طیف سنجی تشدید مغناطیس هسته‌ای (HNMR[1]). نتایج به‌دست آمده از طیف سنجی نمونه‌های ادرار کودکان بیمار با استفاده از روش ^{1}HNMR در شکل (۲) نشان داده شده است. مقایسه طیف‌های نمونه‌های کودکان بیمار با نمونه‌های کودکان سالم، تفاوت‌هایی را در جابه‌جایی‌های شیمیایی ppm ۹–۶ (ترکیبات با ساختار آروماتیک) نشان دادند و متابولیت فنیل‌آلانین به عنوان بیومارکر بیماری فنیل‌کتونوری در جابه‌جایی شیمیایی ۷,۳۳ نمایان گردید.



شکل۲. طیف NMR بیمارفنل کتونوری با جابجایی شیمیایی بین ppm ۹–۶

نتایج آنالیز اجزای اصلی (PCA). داده‌های حاصل از طیف سنجی مورد آنالیز اجزای اصلی قرار گرفت و جابه‌جایی‌های شیمیایی متابولیت‌های متمایز در دو گروه سالم و کودکان بیمار از هم جداسازی و دسته‌بندی شدند (شکل ۳).



شکل ۳. گراف جداسازی متابولیت ها ی متغیر در دو گروه سالم و بیمار براساس تست آنالیز اجزای اصلی . محور X لودینگ ۱ و محور Y لودینگ ۲ می باشد . اعداد داخل گراف نماینگر جابجائی شیمیائی متابولیت ها می باشند.

نتایج حاصل از شبکه عصبی مصنوعی. در این بررسی به منظور طراحی مدل شبکه عصبی در مرحله‌ی آموزش از ۵۶ نمونه (۱۷ نمونه کنترل و ۳۹ نمونه بیمار) استفاده و مدل‌سازی انجام گرفت و نرخ خطای مدل طراحی شده برابر با ۰/۰۰٪ بود. در مرحله دوم به منظور انجام تست صحت شبکه بر روی مدل طراحی شده از نمونه‌های باقی‌مانده ۲۴ نمونه (۱۶ بیمار و ۸ نمونه کنترل) که قبلاً بیمار یا نرمال بودن آن‌ها با تست‌های تشخیصی HPLC ارزیابی شده بودند، استفاده گردید. مشاهده شد که مدل طراحی شده در این مطالعه توانست از ۸ نمونه کودک سالم، ۶ نمونه را به عنوان سالم و ۲ نمونه را به عنوان بیمار معرفی نماید. هم‌چنین از ۱۶ نمونه کودکان بیمار، هر ۱۶ نمونه به طور صحیح، بیمار شناسایی گردیدند. نرخ خطای مدل شبکه عصبی طراحی شده در نهایت برابر با ۰/۲٪ می‌باشد. نتایج حاصل از این مدل‌سازی در جدول ۱ و۲ نشان داده شده است.

جدول ۱. مدل شبکه عصبی در تشخیص بیماری فنیل کتونوری

مدل سازی شبکه عصبی (Classifier Performance)						
۰/۰۰۰			نرخ خطا[1]			
ماتریس در هم ریختگی[3]			میزان تخمین [2]			
جمع	بیمار	سالم		مانعیت[5]-۱	جامعیت [4]	
۱۷	۰	۱۷	سالم	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	سالم
۳۹	۳۹	۰	بیمار	۰/۰۰۰	۱/۰۰۰	بیمار
۵۶	۳۹	۱۷	جمع			

مدل ساخته شده با ۷۰ ٪ نمونه کودکان سالم و بیمار

1-Error rate. 2- Values. Prediction. 3- Confusion matrix. 4- Recall. 5- Precision.

جدول ۲. تست و ارزیابی عملکرد مدل شبکه عصبی در تشخیص بیماری فنیل کتونوری

تست شبکه (Validation Test)						
۰/۲۰۰۰			نرخ خطا[1]			
ماتریس در هم ریختگی[3]			میزان تخمین[2]			
جمع	بیمار	سالم		مانعیت[5]-۱	جامعیت[4]	
۸	۲	۶	سالم	۰/۰۰۰	۰/۳۳۳	سالم
۱۶	۱۶	۰	بیمار	۰/۲۲۲	۰/۰۰۰	بیمار
۲۴	۱۸	۶	جمع			

آزمون اعتبار سنجی وارزیابی مدل شبکه عصبی با ۳۰ ٪ نمونه کودکان سالم و بیمار

1-Error rate. 2- Values Prediction. 3- Confusion matrix. 4- Recall. 5- Precision.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری فنیل‌کتونوری یکی از بیماری‌های ژنتیکی شایعی است که هنوز درمان کامل و قطعی برای آن یافت نشده است. اما پیشگیری و کاهش بروز علائم بالینی شدید این بیماری در صورت تشخیص به موقع امکان‌پذیر است [۱۷]. تشخیص سریع، به موقع و با کم‌ترین درصد خطا در این بیماری همواره به عنوان یکی از دغدغه‌های پزشکان و بیماران می‌باشد. در سال‌های اخیر در کشورهای پیشرفته غربالگری نوزادان، جهت بیماری‌های متابولیکی شدید به طور گسترده انجام می‌گیرد [۱۹،۱۸].

در مطالعاتی که تاکنون با استفاده از روش‌های مختلف بر روی بیماری فنیل‌کتونوری انجام گرفته است، میزان افزایش غلظت اسید آمینه فنیل‌آلانین در خون افراد مبتلا به این بیماری به عنوان بیومارکر اصلی در شناسایی افراد بیمار معرفی گردیده است [۲۰]. سنجش میزان غلظت فنیل‌آلانین در خون بیماران فنیل‌کتونوری با استفاده از روش کیت‌گاتری به‌عنوان ساده‌ترین روش تشخیصی می‌باشد [۲۲،۲۱]. اما بر اساس گزارش‌ها نتایج این روش به دلیل داشتن خطاهای مثبت و منفی کاذب به تنهایی قابل قبول نمی‌باشند. مطالعه‌ای که در سال ۱۹۶۶ توسط چارلز و همکاران بر روی این بیماری انجام گرفت، نشان می‌دهد که نتایج حاصل از کیت گاتری دارای خطاهای مثبت و منفی کاذب بوده و نمی‌تواند به تنهایی قابل قبول باشند [۲۳] و بایستی نتایج آن با یک روش تشخیصی دیگری نیز تایید گردد که معمولاً روش HPLC مورد استفاده قرار می‌گیرد [۶]. بنابرین پروسه تشخیص این بیماری طولانی و زمان‌بر است.

در سال‌های اخیر در کشورهای پیشرفته، بررسی متابولیکی مایعات زیستی بدن با استفاده از روش‌های تشخیصی نوین متابولومیکس به عنوان یک ابزار تشخیصی مهم در بسیاری از بیماری‌ها به‌کاربرده می‌شود. با شناسایی قابلیت‌ها و توانمندی‌های تکنیک طیف سنجی NMR در زمینه تشخیص و شناسایی انواع بیماری‌های متابولیسمی، ماهیت غیر تهاجمی آن و هم‌چنین امکان تکرارپذیری آزمایش‌ها و استفاده مجدد از نمونه‌ها، این تکنیک را به عنوان یکی از روش‌های نوین و پیشرفته جهت مطالعه بیماری فنیل‌کتونوری معرفی کرده است [۲۴-۲۶]. اما تابه حال در ایران از این روش تشخیصی جدید در زمینه شناسایی بیماری‌های متابولیسمی استفاده نشده است. ما در این مطالعه برای نخستین بار از روش طیف سنجی NMR، جهت استخراج متابولیت‌های غیر نرمال موجود در نمونه‌های ادرار بیماران و تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر این بیماری استفاده نموده‌ایم. در این تحقیق، برخلاف روش‌های تشخیصی متداول از نمونه‌های ادرار بیماران فنیل‌کتونوری جهت بررسی پروفایل متابولولیکی آن‌ها استفاده شده است. ادرار یک منبع غنی از متابولیت‌هاست که به‌عنوان نمونه زیستی بسیار متداول در

متابولومیکس در تشخیص بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود [۱۷،۹]. تغییرات غلظت متابولیت‌ها در مقایسه با پروتئین‌ها و ژنوم به آسانی آشکار شده [۲۷] و در نتیجه شناسایی متابولیت‌های غیر نرمال در نمونه‌های مورد بررسی راحت‌تر و سریع‌تر انجام می‌گیرد. با توجه به گروه هدف مورد بررسی (کودکان) به دلیل ماهیت غیرتهاجمی این روش تشخیصی، هیچ آسیبی به بیماران نمی‌رسد، در نتیجه این روش تشخیصی بیش‌تر مورد رضایت بیماران و والدین آن‌ها می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از تحقیق پیش رو نشان می‌دهد که غلظت اسید آمینه فنیل‌آلانین به عنوان بیومارکر تشخیصی بیماری فنیل‌کتونوری در طیف‌های نمونه‌های ادرار این بیماران در جابه‌جایی ppm ۱۳/۷ افزایش چشمگیری در مقایسه با نمونه‌های افراد سالم دارند (شکل۲)، علاوه بر افزایش غلظت فنیل‌آلانین متابولیت‌های غیر نرمال دیگری نیز در نمونه ادرار بیماران شناسایی شدند که با روش‌های تشخیصی متداول این بیماری شناسایی نمی‌گردند و مورد توجه قرار نمی‌گیرند. این متابولیت‌های غیر نرمال دارای ساختارهای آروماتیک می‌باشند که در طیف‌های حاصل از طیف سنجی NMR در جابه‌جایی‌های شیمیایی ppm ۹-۶ شناسایی و تشخیص داده شدند. با مقایسه آنالیز طیف‌های دو گروه سالم و بیمار با تست (PCA) این متابولیت‌های غیرنرمال جداسازی و دسته‌بندی گردیدند (شکل ۳). با بررسی‌های دقیق‌تر و بیش‌تر این متابولیت‌های غیر نرمال، امکان دست‌یابی به بیومارکرهای تشخیصی جدید بیماری فنیل‌کتونوری وجود دارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط ژیانگو (Xianguo Xia) و همکارانش صورت گرفت، نشان داده شد که روش‌های آنالیز اجزای اصلی و حداقل مربعات جزئی (به‌طور روتین در تحقیقات متابولومیکس استفاده می‌شوند) به همراه آنالیز منحنی‌های ROC (که یک روش استاندارد برای توضیح و انجام تست‌های پزشکی می‌باشد) امکان تعیین بیومارکرها را فراهم می‌آورند. هم‌چنین مشخص گردیده که روش‌های متابولومیکس به انضمام آنالیزهای چندمتغیره منجر به کشف بیومارکرهای چندگانه خواهد شد [۲۸].

تاکنون مطالعات مشابه بسیاری همسو با تحقیق پیش رو بر روی بیماری فنیل‌کتونوری انجام گرفته است از جمله: در سال ۲۰۰۵ ماریاکنستانتینو (Maria A. Constantinou) و همکارانش از روش H-NMR، برای تشخیص بیماری‌های متابولیسمی در نمونه‌های ادرار استفاده کردند. طیف‌های به‌دست آمده از نمونه‌های ادرار ۴۷ کودک سالم و ۹ کودک مبتلا به فنیل‌کتونوری را بررسی نموده و با مقایسه آن‌ها تفاوت‌هایی را در غلظت فنیل‌آلانین و متابولیت‌های دیگر از جمله اسید آمینه‌های شاخه‌دار (والین، لوسین و ایزولوسین) به‌دست آوردند [۸] که مورد تائید این تحقیق نیز قرار گرفت.

در سال ۲۰۰۶ ژنگ پن (Zhengh Pan) و همکارانش در مطالعه‌ای با استفاده از NMR و اسپکتروسکوپی جرمی نمونه‌های ادرار بیماران متابولیسمی از جمله فنیل‌کتونوری را بررسی کردند. در این مطالعه اسیدآمینه‌های فنیل‌آلانین، سیترات، آلانین و دو ترکیب دیگر غیر نرمال در نمونه‌های ادرار بیماران فنیل‌کتونوری مشخص گردید [۲۹]. در جدیدترین تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ توسط سلدا بلبل (Selda Bülbül) انجام گرفت، از نمونه‌های ادرار ۹۸۶ نوزاد مبتلا به بیماری‌های متابولیسمی مادرزادی از جمله بیماری فنیل‌کتونوری طیف NMR تهیه گردید. نتایج مطالعه این محقق نشان داد که این تکنیک به عنوان یکی از روش‌های نوین و پیشرفته دارای قابلیت‌ها و توانمندی‌های بسیار بالایی در شناسایی دقیق‌تر و سریع‌تر بسیاری از بیماری‌های متابولیسمی از جمله بیماری فنیل‌کتونوری می‌باشد [۳].

تمایز تحقیق پیش رو با مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته، در این است که ما در این مطالعه علاوه بر استفاده از روش نوین طیف سنجی NMR جهت تشخیص بیماران فنیل‌کتونوری از روش هوشمند شبکه عصبی پرسپترون چند لایه (MLP) جهت مدل‌سازی نتایج حاصل از مقایسه آنالیز نمونه‌های کودکان بیمار و سالم استفاده نموده‌ایم و در نهایت یک مدل مناسب جهت پیش‌بینی این بیماری ارائه کرده‌ایم (جدول ۲). در انجام این مدل‌سازی علاوه بر بیومارکر تشخیصی فنیل‌کتونوری (متابولیت در جابه‌جایی‌های شیمیایی ppm

۷/۳۳)، متغیرهـای شناسـایی شـده دیگـر (متابولیـت‌هـا در جابه‌جایی‌هـای شـیمیایی ppm ۹-۶) نیـز در تشـخیص ایـن بیماری مورد استفاده قرار گرفته شدند. بنابراین احتمال نادیده گرفتن برخی از عوامل خطای متابولیتی به میـزان بـیش‌تـری کاهش یافته و صحت تشخیص بیش‌تر گردید.

مدل طراحـی شـده در ایـن تحقیـق توانسـت در مرحلـه آموزش با موفقیت ۱۰۰٪ و بدون هیچ‌گونه خطایی، دو گـروه کودکان سالم و بیمار را از هـم تفکیـک و دسـته‌بنـدی نمایـد (جدول ۱) و در مرحله تست مدل طراحی شده، نرخ خطا تنها ۰/۲٪ بوده است (جدول ۲). بر اساس این نتایج مدل طراحـی شده قادر به شناسایی و تشخیص بیمـاران فنیـل‌کتونـوری بـا موفقیت بالای ۹۰٪ می‌باشـد. نتـایج نشـان مـی‌دهنـد کـه در مقایسه با روش‌های تشخیصی متداول مانند کیت گـاتری (بـا خطاهای منفی و مثبت کاذب بالا) و روش HPLC (با خطـای ۲/۵٪) میزان خطـای روش تشـخیص بیمـاری متابولیسـمی فنیل‌کتونوری به کمـک طیـف سـنجی NMR و مـدل شـبکه عصبی تنها ۰/۲٪ می‌باشد.

با توجه به شیوع نسبتاً بالای بیماری‌هـای متابولیسـمی و افزایش رو به رشد کودکان با مشـکلات جسـمی و ذهنـی در جامعه، نیاز به یک روش تشخیصی به موقع، سریع و در عـین حال کم‌هزینه، جهت جلوگیری از شیوع این گروه از بیماری‌ها ضروری می‌باشد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، تاییدکننده توانمندی و قدرت بالای روش طیف سنجی NMR بـه همـراه مدل شبکه عصـبی در زمینـه تشـخیص و شناسـایی بیمـاری فنیل‌کتونوری با دقت بیش‌تر و میزان خطای کم‌تر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر را همکاران بخش بیوشـیمی انستیتو پاستور ایران بخاطر همکاری ارزشمندشان می نمایند.

منابع

[1] Centerwall SA, Centerwall WR. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. Pediatrics 2000; 105: 89-103.

[2] Farhud D, Shalileh M. Phenylketonuria and its dietary therapy in children. 2009.

[3] Bülbül S. Novel approach for newborn errors in metabolism screening (NEMS) by NMR: Clinical NEMS-by-NMR Study in Turkey. Clin Biochem 2014; 9: 700-701.

[4] Mokhtari R, Bagga A. Consanguinity, genetic disorders and malformations in the Iranian population. Acta Biologica Szegediensis 2003; 47: 47-50.

[5] Rao AN, Kavitha J, Koch M, Kumar VS. Inborn errors of metabolism: Review and data from a tertiary care center. Indian J Clin Biochem 2009; 24: 215-222.

[6] Dougherty FE, Levy HL. Present newborn screening for phenylketonuria. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 1999; 5: 144-149.

[7] Arjmand M, Kompany-Zareh M, Vasighi M, Parvizzadeh N, Zamani Z, Nazgooei F. Nuclear magnetic resonance-based screening of thalassemia and quantification of some hematological parameters using chemometric methods. Talanta 2010; 81: 1229-1236.

[8] Viant MR, Rosenblum ES, Tjeerdema RS. NMR-based metabolomics: a powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. Environ Sci Technol 2003; 37: 4982-4989.

[9] Zhang A, Sun H, Wu X, Wang X. Urine metabolomics. Clinica Chimica Acta 2012; 414: 65-69.

[10] Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. J Pharm Biomed Anal 2000; 22: 717-727.

[11] Brougham D, Ivanova G, Gottschalk M, Collins D, Eustace A, O'Connor R, Havel J. Artificial neural networks for classification in metabolomic studies of whole cells using 1 h nuclear magnetic resonance. J Biomed Biotechnol 2010; 2011: 158094.

[12] Long W. Medical diagnosis using a probabilistic causal network. Appl Artific Int Intern J 1989; 3: 367-383.

[13] Long WJ. Flexible reasoning about patient management using multiple models. Artific Int Med 1991; 3: 3-20.

[14] Arjmand M, Akbari Z, Taghizadeh N, Shahbazzadeh D, Zamani Z. NMR-based metabonomics survey in rats envenomed by Hemiscorpius lepturus venom. Toxicon 2015; 94: 16-22.

[15] Viant MR. Revealing the metabolome of animal tissues using 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. Methods Mol Biol 2007; 358: 229-246.

[16] Sadoughi F, Sheikhtaheri A. Applications of artificial intelligence in clinical decision making: Opportunities and challenges. Director General 2011; 8.

[17] Raghuveer TS, Garg U, Graf WD. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: an update. Am Fam Phys 2006; 73: 1981-1990.

[18] Liebl B, Nennstiel-Ratzel U, Roscher A, von Kries R. Data required for the evaluation of newborn screening programmes. Eur J pediat 2003; 162: S57-S61.

[19] Liebl B, Nennstiel-Ratzel U, von Kries R, Fingerhut R, Olgemöller B, Zapf A, Roscher AA. Expanded newborn screening in Bavaria: tracking to achieve requested repeat testing. Prev Med 2002; 34: 132-137.

[20] Hanley WB. Phenylketonuria (PKU)-A Success Story: INTECH Open Access Publisher; 2012.

[21] Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32: 338-343.

[22] Koch J. Robert guthrie--the PKU story: a crusade against mental retardation: Hope Publishing House; 1997.

[23] Blumenfeld CM, Wallace MJ, Anderson R. Phenylketonuria—the guthrie screening test—A method of

quantitation, observations on reliability and suggestions for improvement. Calif Med 1966; 105: 429.

[24] Constantinou MA, Papakonstantinou E, Spraul M, Sevastiadou S, Costalos C, Koupparis MA, et al. 1 H NMR-based metabonomics for the diagnosis of inborn errors of metabolism in urine. Anal Chim Acta 2005; 542: 169-177.

[25] Ozand PT. Diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. Annal Saudi Med 1998; 18: 234-238.

[26] Williams RA, Mamotte CD, Burnett JR. Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. Clin Biochem Rev 2008; 29: 31.

[27] Gupta A. To err is genetics: diagnosis and management of inborn errors of metabolism (IEM). Anthropology Today: Trends, Scopes and Applications 2007; 415-423.

[28] Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. Metabolomics 2013; 9: 280-299.

[29] Zhengzheng p, Haiwei G, Nari T, Huanwen C, Narasimhamurthy S, Bryan EH, R GC, Daniel R. Principal component analysis of urine metabolites detected by NMR and DESI–MS in patients with inborn errors of metabolism. Anal Bioanal Chem 2007; 387: 539-549.

Non-invasive diagnosis of phenylketonuria by using artificial neural networking and nuclear magnetic resonance spectroscopy

Fatemeh Dorosti (M.Sc)[1,2], Zahra Zanganeh (M.Sc)[1], Roghayeh Mirzazadeh (Ph.D)[1], Zahra Zamani (Ph.D)[1], Mohammad Arjmand(Ph.D)[*1] and Sedighe Sadeghi (Ph.D)[1]
1 - Dept. Of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2 - Dept of Biochemistry, Payam Noor, Tehran, Iran

(Received: 14 Sep 2015; Accepted: 30 Dec 2015)

Introduction*:* Phenylketonuria (PKU) is a relatively common metabolic disease in world .The high incidence of the disease in our country is due to consanguineous marriages. The prevalence of this disease in Iran is reported to be about 1: 4000 to1: 8,000 births per year. Mental retardation, physical disabilities, neurological disorders are the clinical symptoms of the disease. Early diagnosis is very important to prevent the disabling consequences of the disease. The purpose of this study was to use a multi-layer neural network perceptron (MLP) to build a model for early detection and treatment of phenylketonuria patients..

Materials and Methods: Urine samples were obtained from healthy and PKU children. nuclear magnetic resonance spectroscopy was performed in NMR 400 MHz Bruker with the help of NOESY Protocol. Then peak resonance of each metabolite was identified, and modeling was done with multi-layer neural network perceptron.

Results*:* The Model build in this study was able to classify the data in two groups of patient and healthy individuals successfully, with more than 90% sensitivity and 0.2% error rate with high predictive power

Conclusion*:* Our results showed the high power capability of this technique to diagnose the Phenylketonuria with the help of NMR spectroscopy and artificial neural network.

Keywords*:* Phenylketonuria, Artificial neural networking, Magnetic Resonance Spectroscopy

* Corresponding author. Tel: +98 21 66402770
Arjmand1@yahoo.com