

## بررسی موتاسیون‌های شایع ژن اسفنگومیلیناز در بیماران مبتلا به نیمن پیک نوع A و B در شمال غرب ایران

الناز عابدینی<sup>۱</sup>، سید مجتبی محدث اردبیلی<sup>۲</sup>، عباسعلی حسینپور فیضی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۴/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۴/۱۱/۳۰

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** نیمن پیک نوع A و B، اختلالات اتوزومال مغلوب و نادری هستند که در اثر جهش‌های موجود در ژن «اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱» ایجاد شده و موجب نقص یا کمبود فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز می‌شوند. نقص یا کمبود آنزیم اسفنگومیلیناز، باعث تجمع غیرطبیعی اسفنگومیلین در بافت‌های بدن شده و در نتیجه، موجب بروز علائم بالینی مختلفی همچون بزرگی کبد و طحال، عوارض تنفسی، لکه قرمز آلبالویی در ماکولای چشم و اختلالات عصبی می‌شود.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه مشخصات هفت بیمار غیرخوشاوند مبتلا به نیمن پیک A و B، از اقوام آذری شمال غرب ایران، با استفاده از فن توالی‌یابی آگزون‌های ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱ گزارش شد. درباره پلی‌مورفیسم توالی تکرارهای برای به‌دست‌آوردن اطلاعات بیشتر شش نوکلئوتیدی c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8) گروه کنترلی متشکل از پنجاه فرد سالم طراحی شد.

**یافته‌ها:** جهش L137P به‌صورت هموزیگوت در سه نفر از هفت بیمار مبتلا، پلی‌مورفیسم rs1050239 به‌صورت هموزیگوت در چهار نفر از بیماران و پلی‌مورفیسم rs1050228 به‌صورت هموزیگوت در یکی از بیماران و پلی‌مورفیسم توالی تکرارهای شش نوکلئوتیدی در شش نفر از بیماران به‌صورت هموزیگوت و هتروزیگوت مشاهده شد. آلل با چهار تکرار شش نوکلئوتیدی دارای بیشترین فراوانی بود. آلل با چهار تکرار شش نوکلئوتیدی دارای بیشترین فراوانی در هر دو گروه بیماران و افراد سالم بوده و سپس آلل‌هایی با پنج، شش و هفت تکرار شش نوکلئوتیدی به‌ترتیب دارای فراوانی‌های بعدی بودند.

**نتیجه‌گیری:** L137P تنها جهش بیماری‌زا است که در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد.

**واژه‌های کلیدی:** نیمن پیک، ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱، آنزیم اسفنگومیلیناز

مجله دانشکده پرستاری و مامایی ارومیه، دوره سیزدهم، شماره دوازدهم، پی‌درپی ۷۷، اسفند ۱۳۹۴، ص ۱۰۴۱-۱۰۵۳

آدرس مکاتبه: تبریز، خیابان گلگشت، ساختمان آزادی، طبقه چهارم، آزمایشگاه ژنتیک پزشکی، تلفن: ۰۹۱۴۱۱۷۰۳۴۵

Email: mohaddesmo@yahoo.com

### مقدمه

اسفنگومیلیناز<sup>۱</sup> ایجاد می‌شوند. آنزیم اسفنگومیلیناز در متابولیسم اسفنگومیلین دخیل است و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده ضروری در مسیر پیام‌دهی وابسته به سرامید عمل می‌کند (۲، ۳). نیمن پیک نوع C و D در اثر جهش یا نقص در یکی از دو ژن دخیل در متابولیسم کلسترول ایجاد می‌شوند: نیمن پیک نوع C<sup>۲</sup> (OMIM; 607623) و نیمن پیک نوع C<sup>۳</sup> یا D (OMIM;

بیماری نیمن پیک اختلال متابولیکی و نادری است که در نتیجه اختلال در روند متابولیسم اسفنگولیپیدها یا اختلال در استریفیکاسیون و حمل‌ونقل کلسترول ایجاد شده و از لحاظ بالینی به چهار نوع تقسیم‌بندی می‌شود (۱).

نیمن پیک نوع A و B در اثر اختلال و نقص در آنزیم

<sup>۱</sup> گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران  
<sup>۲</sup> گروه ژنتیک، واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران  
<sup>۳</sup> گروه ژنتیک، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران  
<sup>۴</sup> گروه ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>1</sup> sphingomyelinase

<sup>2</sup> Niemann-Pick disease, type C1(NPC1)

<sup>3</sup> Niemann-Pick disease, type C2(NPC2)

نوع A و B بیماری، نوع متوسطی به نام A/B وجود دارد که در سنین دو تا هفت سال بروز می‌کند و با اختلالات عصبی، تأخیر در رشد خفیف و لکه قرمز آلبالویی همراه است (۲۵).

ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱ تنها ژنی است که در ارتباط با بیماری نیمین پیک شناسایی شده است. تا به امروز حدود صد جهش ژنتیکی مربوط به ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱ و بیماری نیمین پیک یافت شده که اغلب این جهش‌ها به صورت اختصاصی در خانواده‌ها و اقوام مختلف دیده شده است (۲۶-۲۹)؛ بنابراین تشخیص و پیش‌بینی ژنتیکی، هنگامی که فنوتیپ و علائم بالینی قادر به تعیین دقیق نوع بیماری نیست، ضروری است.

در این مطالعه، مشخصات هفت بیمار غیرخویشاوند ایرانی مبتلا به نیمین پیک نوع A و B از شمال غرب ایران با نژاد ترک آذری گزارش شد. مطالعه حاضر، اولین گزارش تشخیص ژنتیک مولکولی مربوط به بیماری نیمین پیک در شمال غرب ایران است.

### مواد و روش‌ها

در این مطالعه، هفت بیمار غیر خویشاوند مبتلا به نیمین پیک نوع A و B از جمعیت شمال غرب ایران، با نژاد ترک آذری مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران مورد نظر، توسط پزشکان متخصص غربالگری شده و برای بررسی مولکولی در این مطالعه معرفی شدند. تشخیص بر اساس ویژگی‌های بالینی بیماران از جمله بزرگی کبد و طحال، تورم شکم، اختلال در رشد، لکه‌های قرمز آلبالویی در ماکولای چشم و برخی اقدامات پاراکلینیکی شامل آزمون عملکرد کبدی، اسکن مغز بیماران، آزمون اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز و هم‌چنین اسپیراسیون مغز استخوان و مشاهده ماکروفاژهای انباشته از چربی به شکل حباب آب یا کف صابون در مغز استخوان بیماران، حاصل گردید. اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اسفنگومیلیناز به‌طور مستقیم توسط محقق صورت نگرفت و توسط پزشکان متخصص کمبود فعالیت آنزیمی در بیماران تأیید شد.

تمام بیماران با آگاهی و رضایت کامل در این مطالعه حضور یافتند. تمامی منبع مالی مطالعه حاضر توسط محقق تأمین شد. حدود دو میلی‌لیتر خون داخل وریدی، توسط کادر مجرب آزمایشگاه از بیماران گرفته شد و در ظروف مخصوص حاوی اتیلن دی آمین تترا استیک اسید<sup>۵</sup> جمع‌آوری گردید. در روش‌های مولکولی برای جلوگیری از انعقاد خون از هپارین استفاده نمی‌شود چون از فعالیت آنزیم تگ پلیمرز جلوگیری می‌کند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش استخراج دستی بدون پروتئیناز K انجام شد. علت انتخاب این روش، کم‌هزینه و سریع‌تر بودن آن نسبت به روش‌های

601015) (۴) که به ترتیب در جایگاه کروموزومی 18q11-q12 و 14q24.3 قرار گرفته‌اند (۵، ۶). نقایص ژنی NPC1 و NPC2 موجب اختلال در حمل‌ونقل داخل سلولی کلاسترول و دیگر لیپیدهای داخل سلول شده و در نتیجه تجمع غیرطبیعی کلاسترول را در بافت‌هایی نظیر مغز استخوان، کبد، طحال و... در پی دارد (۷، ۸). این گروه احتمالاً بزرگ‌ترین گروه بیماران نیمین پیک را شامل می‌شوند. مطالعات نشان داده است در بیماران با نیمین پیک نوع C و D اتصال و الحاق کلاسترول به لیپوزوم نرمال می‌باشد درحالی‌که حمل‌ونقل مناسب کلاسترول به شبکه اندوپلاسمی دچار اختلال است (۹). در نوع شدید زودرس، برخی از بیماران با اختلال عملکرد پیش‌رونده کبد یا آسیت قبل از بروز علائم عصبی تظاهر می‌کنند که منجر به مرگ می‌شود. برخی دیگر با تأخیر تکامل از دوره شیرخوارگی، شروع دژنراسانس عصبی در ۳ سالگی و سایرین با کاهش تونوس عضلانی تظاهر می‌کنند (۱۰).

نیمین پیک نوع A و B که در اثر نقص و کمبود آنزیم اسفنگومیلیناز ایجاد می‌شوند، از نظر ژنتیکی به صورت اتوزومی مغلوب به ارث می‌رسند (۱۱). ژن مربوط به آن‌ها، اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱<sup>۴</sup> (OMIM:607608) که در جایگاه کروموزومی 11(p15.1- p15.4) قرار گرفته است، از شش اگزون تشکیل شده و پروتئینی با ۶۳۱ اسیدآمینه کد می‌کند (۱۲، ۱۳).

اسفنگومیلیناز گلیکوپروتئینی است که در کیسه‌های ترشحی و در قسمت خارجی غشای پلاسمایی یافت می‌شود (۱۴، ۱۵) و نقش مهمی در تکثیر سلولی، تمایز سلولی، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول و هم‌چنین واکنش‌های ایمنی و التهابی ایفا می‌کند (۱۶، ۱۷). اسفنگومیلیناز، اسفنگومیلین را به سرامید و فسفوریل کولین تبدیل می‌کند (۱۸). تولید سرامید یک واکنش حیاتی در مواجهه با استرس‌های محیطی و سلولی محسوب می‌شود و به‌عنوان یک پیام‌بر لیپیدی، در پیشبرد این واکنش‌ها عمل می‌کند (۱۹). افزایش سطح سرامید در سلول، باعث القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول می‌شود؛ درحالی‌که افزایش متابولیت‌های فسفریله آن، مانند اسفنگوزین یک فسفات، باعث القای تکثیر سلولی می‌شود (۲۰).

نیمین پیک نوع A سیر حاد و شدیدی داشته و علائم بیماری در دوران شیرخوارگی بروز می‌کند (۱۳). این بیماری با علائم بالینی همچون بزرگی شدید کبد و طحال، لکه‌های قرمز آلبالویی در ماکولای چشم، اختلالات عصبی پیش‌رونده و مرگ زودهنگام در حدود دو تا سه‌سالگی مشخص می‌شود (۲۱-۲۳). نوع B بیماری سیر پیشرفت کندتری داشته و با بزرگی کبد و طحال و درگیری ریوی در سنین کودکی تا بزرگ‌سالی بروز می‌کند (۲۴). علاوه بر

<sup>5</sup>Ethylenediaminetetraacetic Acid(EDTA)

<sup>4</sup> Sphingomyelin phosphodiesterase1(SMPD1)

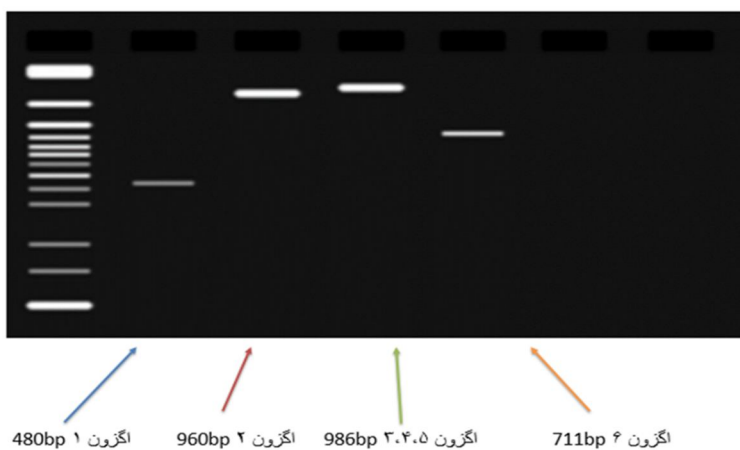
برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز<sup>۶</sup> به شرح زیر است: واسرشت‌سازی<sup>۷</sup> اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، سپس ۳۵ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت چهار ثانیه، پس از آن چهار ثانیه اتصال<sup>۸</sup> در دمای اختصاصی هر پرایمر و گسترش<sup>۹</sup> در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار ثانیه. نمونه محصولات PCR ران شده گروه بیماران روی ژل آگارز در شکل شماره یک به‌طور خلاصه نشان داده شده است.

دیگر است. آگزون‌های یک تاشش ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱ و نواحی مرزی آگزون- اینترون با استفاده از چهار جفت پرایمر اختصاصی، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، در حجم ۲۵ میکرولیتر تکثیر شد. طراحی پرایمرها با استفاده از برنامه پرایمر ۳ (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) انجام گرفت. سنتز پرایمرها توسط شرکت پیشگام بیوتکنولوژی انجام شد. توالی پرایمرهای طراحی شده در جدول شماره یک نشان داده شده است.

**جدول (۱):** آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن. پرایمرهای طراحی شده فقط ناحیه کدکننده ژن، شامل تمام آگزون ها و نواحی اتصال

بین آگزون ها و اینترون ها را در بر می‌گیرند.

شماره آگزون	نام آغازگر	توالی	دمای Tm
1-Reverse	SMPD1-1R	'۵-CCCCAGCACTCCTTTCGG-3'	62
1-Forward	SMPD1-1F	'۵-AGAAGGGTAGGGTGTCC-3'	62
2-Reverse	SMPD1-2R	5'-GCAATCAGAGACAATGCCCC-	61
2-Forward	SMPD1-2F	5'-CAGTTTGAAATGGAGGCCCC-	61
3,4,5-Reverse	SMPD1-3,4,5R	5'-CTCCTTCCCCTATCCCACCA-3'	63
3,4,5-Forward	SMPD1-3,4,5F	TGGGGAAGATGTCATGTATGC-3'	63
6-Reverse	SMPD1-6R	CTCCATGGCTGTGAAAGGAC--'۵	63
6-Forward	SMPD1-6F	5'-'۱CCTCCCTGGAGTCCTTG-3'	63



**شکل (۱):** محصولات PCR ران شده گروه بیماران روی ژل آگارز. تصویر به ترتیب از سمت چپ به راست معرف ladder 50 bp نمونه محصول PCR آگزون ۱ که طولی در حدود ۴۸۰ جفت باز دارد، نمونه محصول PCR آگزون ۲ که طولی در حدود ۹۶۰ جفت باز دارد، نمونه محصول PCR آگزون ۳، ۴، ۵ که طولی در حدود ۹۸۶ جفت باز دارد و نمونه محصول PCR آگزون ۶ که طولی در حدود ۷۱۱ جفت باز دارد.

ایران، گروه کنترلی متشکل از پنجاه فرد سالم، با زمینه قومی یکسان با گروه بیماران، طراحی شد. مطالعه روی گروه کنترل با استفاده از

برای جمع‌آوری اطلاعات بیشتر درباره فراوانی پلی‌مورفیسم c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8) در جمعیت شمال غرب

<sup>8</sup>Annealing

<sup>9</sup>Extension/Elongation

<sup>6</sup>Polymerase chain reaction (PCR)

<sup>7</sup>Denaturation

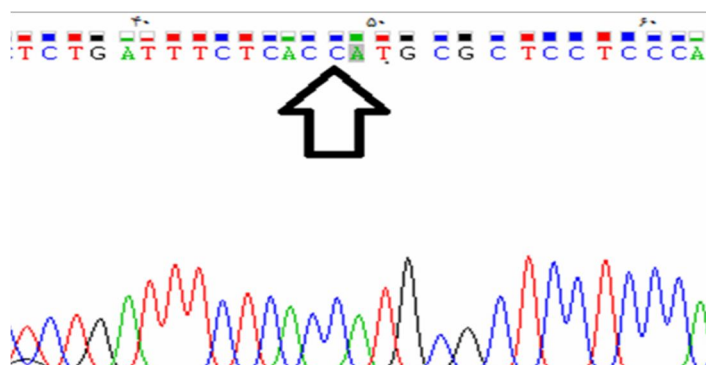
جهت مقایسه توالی های DNA با توالی های منتشر شده در بانک ژنی مورد استفاده قرار گرفت.  
آنالیز نتایج توالی یابی محصولات PCR با استفاده از نسخه ۲،۱،۱ نرم افزار کروماز<sup>۱</sup> انجام گرفت.

### نتایج

با بررسی و آنالیز نتایج حاصل از توالی یابی اگزون های ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱ در هفت بیمار مورد مطالعه، جهش L137P که در اگزون دوم رخ می دهد (شکل ۲)، به صورت هموزیگوت در سه نفر (بیمار شماره یک، سه و چهار) از هفت بیمار مشاهده شد. شش آلل موتانت L137P، تنها آلل های موتانت بیماری را مشاهده شده در جمعیت بیماران مورد مطالعه بودند. جهش های شناسایی شده در بیماران در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

تکنیک الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۳ درصد انجام پذیرفت. هر تکرار ۶ نوکلئوتیدی bp طول دارد. علت استفاده از تکنیک الکتروفورز ژل آگارز صرفه جویی در زمان و هزینه و همچنین یادگیری و استفاده از تکنیک های دیگر در این مطالعه بود. تعدادی از نمونه ها برای حصول اطمینان از نتایج به دست آمده با روش الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز، برای توالی یابی ارسال شدند.

لازم به ذکر است که برای انجام توالی یابی مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه جمع آوری شد و به همراه پرایمرهای مربوطه برای توالی یابی ارسال شد. محصولات به دست آمده از PCR جهت انجام توالی یابی مستقیماً به شرکت پیشگام بیوتکنولوژی ارسال گردید و توسط شرکت کره ای ماکروژن توالی یابی با استفاده از چهار جفت پرایمر ذکر شده انجام شد. برنامه BLAST2.0، قابل دسترسی در پایگاه (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)



شکل (۲): تصویر توالی یابی اگزون دوم بیمار شماره ۴، نشان دهنده جهش بدمعنی c.409T>C L137P می باشد. باعث جایگزینی آمینواسید لوسین با پرولین در جایگاه ۱۳۷ پروتئین می شود (CTA ->CCA).

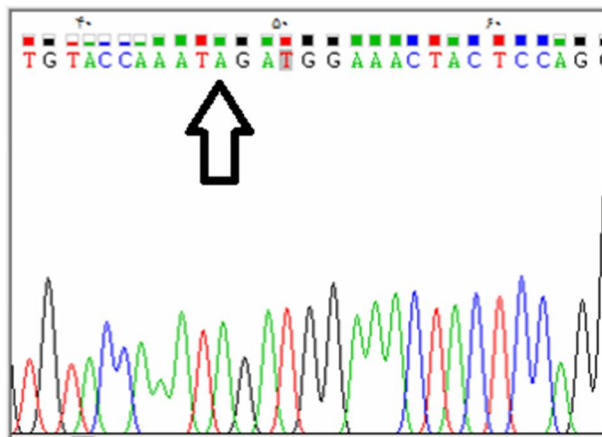
جدول (۲): جهش های شناسایی شده ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز در بیماران

شماره بیمار	سن	جنس	شماره اگزون	بزرگی کبد و طحال	لکه قرمز	تغییر در نوکلئوتیک اسید	تغییر در اسید آمینه
۱	۴	مرد	۲	+	+	c.409T>C	L137P
۳	۱۴	مرد	۲	+	+	c.409T>C	L137P
۴	۱۰	زن	۲	+	+	c.409T>C	L137P

رایج ترین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱ است که باعث جابه جایی گلیاسین با آرژنین در ناحیه ۵۰۸ آنزیم اسفنگومیلیناز می شود (۳۰).

پلی مورفیسم p.G508R; c.1522G>A که در اگزون ششم رخ می دهد (شکل ۳)، در چهار نفر (بیمار شماره یک، دو، سه و چهار) از بیماران به صورت هموزیگوت مشاهده شد. این پلی مورفیسم

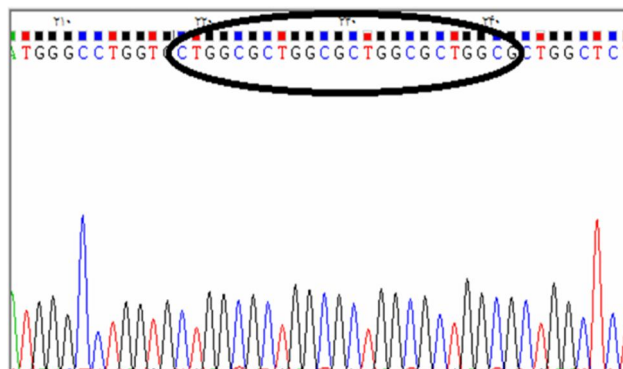
<sup>1</sup> Chromas



**شکل (۳):** تصویر توالی یابی اگزون ششم بیمار ۲، نشان دهنده پلی مورفیسم c.1522Gly508Arg می‌باشد. باعث جایگزینی آمینواسید گلايسين با آرژنين در جایگاه ۵۰۸ پروتئين می‌شود (GGA-> AGA).

شش نوکلئوتیدی است که در اگزون اول رخ داده و در داخل ناحیه سیگنال پپتید آنزیم نابالغ قرار دارد (شکل ۴) (۳۱).

پلی مورفیسم شایع دیگر که در شش نفر از بیماران مورد مطالعه (بیمار شماره یک، دو، سه، چهار، پنج و هفت) به صورت هموزیگوت و هتروزیگوت مشاهده شد، پلی مورفیسم توالی تکرارهای



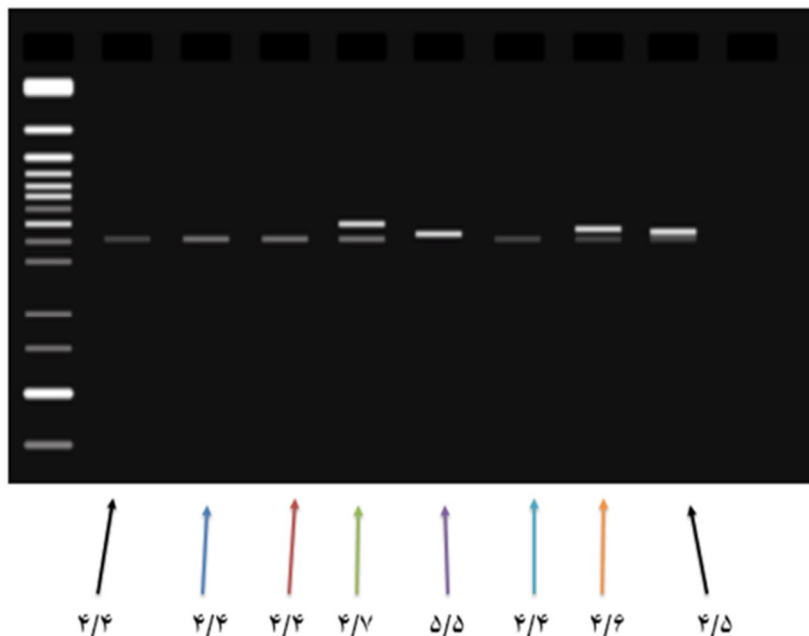
**شکل (۴):** نمونه توالی یابی اگزون اول بیمار شماره ۱، نشان دهنده پلی مورفیسم تکرارهای ۶ نوکلئوتیدی c.108GCTGGC(3-8); p.37LA(3-8) و آل با ۴ تکرار ۶ نوکلئوتیدی می‌باشد.

و آل‌هایی با پنج، شش و هفت تکرار به ترتیب با فراوانی ۱۵٪۷۸، ۱۵٪۷۸ و ۱۰٪۵۲ درصد در گروه کنترل مشاهده شد. در هر دو گروه بیماران و افراد سالم، ژنوتیپ c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[4]+[4] ژنوتیپ غالب بود. نتایج حاصل از توالی یابی تعدادی از نمونه‌های گروه کنترل، با نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR همان نمونه‌ها روی ژل آگارز ۳ درصد مطابقت داشت. تعدادی از نمونه محصولات PCR گروه کنترل که روی ژل آگارز ۳ درصد ران شده، در شکل ۵ نشان داده شده است.

پلی مورفیسم توالی تکرارهای شش نوکلئوتیدی، با تکرارهایی شامل چهار، پنج، شش و هفت تکرار، در جمعیت مورد مطالعه مشاهده شد. بیشترین فراوانی مربوط به آل با چهار تکرار شش نوکلئوتیدی، در هر دو گروه بیماران و افراد سالم است. طبق مطالعات صورت گرفته در جمعیت‌های دیگر، آل‌هایی با پنج، شش و هفت تکرار، شایع‌ترین آل‌ها را میان افراد سالم و بیمار تشکیل می‌دهد (۳۲).

آل با چهار تکرار شش نوکلئوتیدی با فراوانی آلی ۵۷٪۸۹

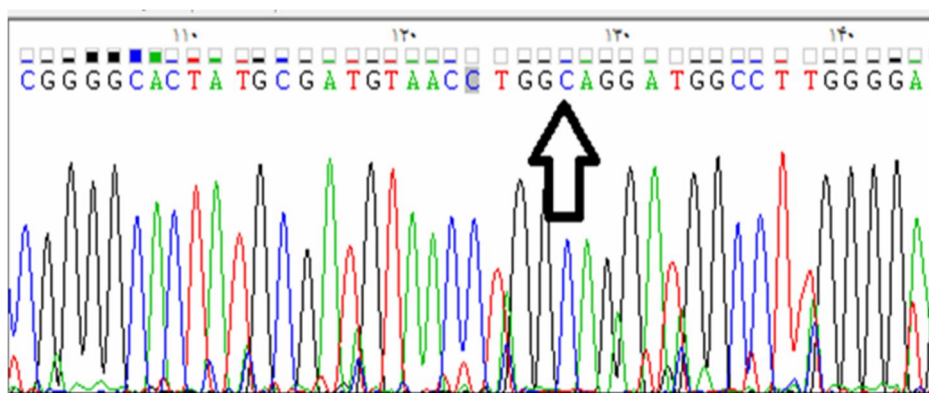
درصد



**شکل (۵):** نمونه محصولات PCR گروه کنترل مورد بررسی که روی ژل آگارز ۳ درصد ران شده است، تصویر نشان دهنده نمونه PCR ۸ نفر از افراد گروه کنترل می باشد که روی ژل آگارز ۳ درصد ران شد که به ترتیب از سمت چپ به راست نشان دهنده ladder 50 bp، فرد هموزیگوت با ژنوتیپ c.108CTGGCG[4]+[4] نسبت به آلل ۴ تکرار ۶ نوکلئوتیدی، فرد با ژنوتیپ هموزیگوت c.108CTGGCG[4]+[4]، فرد با ژنوتیپ هموزیگوت c.108CTGGCG[4]+[7]، فرد با ژنوتیپ هموزیگوت c.108CTGGCG[4]+[4]، فرد با ژنوتیپ هتروزیگوت c.108CTGGCG[4]+[4]، فرد با ژنوتیپ هتروزیگوت c.108CTGGCG[4]+[6] و فردی با ژنوتیپ هتروزیگوت c.108CTGGCG[4]+[5] می باشد.

حذف اولین تکرار در توالی تکرارهای شش نوکلئوتیدی در بیشتر بیماران، این پلی مورفیسیم با کمترین فراوانی در جمعیت بیماران مورد مطالعه مشاهده شد. پلی مورفیسیم های شناسایی شده در بیماران به طور خلاصه در جدول شماره سه نشان داده شده است.

c.107T>C (p.V36A); rs1050228 پلی مورفیسیم دیگری است که در داخل اولین تکرار توالی تکرارهای شش نوکلئوتیدی واقع شده است (شکل ۶). این پلی مورفیسیم به صورت هموزیگوت در یکی از بیماران مورد مطالعه (بیمار شماره شش) مشاهده شد. به علت



**شکل (۶)** تصویر توالی یابی اگزون اول بیمار شماره ۶، نشان دهنده پلی مورفیسیم c.107T>C (p.V36A) است. باعث جایگزینی آمینواسید والین با آلانین در جایگاه ۳۶ پروتئین می شود (GTA->GCA).

جدول (۳): پلی مورفیسم‌های شناسایی شده ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱ در بیماران

شماره بیمار	سن	جنس	شماره اگزون	بزرگی کبد و طحال	لکه قرمز آلبالویی	پلی مورفیسم
۱	۴	مرد	۱	+	+	c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[5]+[6]
۱	۴	مرد	۶	+	+	c.1522G>A; p.G508R
۲	۱۱	زن	۱	+	+	c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[4]+[4]
۲	۱۱	زن	۶	+	+	c.1522G>A; p.G508R
۳	۱۴	مرد	۱	+	+	c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[4]+[4]
۳	۱۴	مرد	۶	+	+	c.1522G>A; p.G508R
۴	۱۰	زن	۱	+	+	c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[4]+[4]
۴	۱۰	زن	۶	+	+	c.1522G>A; p.G508R
۵	۴	مرد	۱	-	+	c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[4]+[5]
۶	۲	زن	۱	+	+	c.107T>C (p.V36A)
۷	۵	مرد	۱	+	+	c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[4]+[6]

فراوانی آللی پلی مورفیسم‌ها و جهش‌هایی شناسایی شده در بیماران در جدول شماره چهار نشان داده شده است.

جدول (۴): فراوانی آللی جهش و پلی مورفیسم‌های شناسایی شده در بیماران

فراوانی آللی	شماره اگزون	تغییر در اسید آمینه	تغییر در نوکلئیک اسید
۴۲/۸۵	۲	L137P	c.409T>C
۶۴/۳۸	۱	P.37LA (3-8)[4]	c.108GCTGGC (3-8)
۱۴/۳۸	۱	P.37LA (3-8)[5]	c.108GCTGGC (3-8)
۲۱/۴۲	۱	P.37LA (3-8)[6]	c.108GCTGGC (3-8)
۷۱/۴۲	۶	p.G508R	c.1522G>A
۱۴/۳۸	۱	p.V36A	c.107T>C

## بحث

است، ولی به ترتیب، با بیشترین فراوانی، در اقوام و جمعیت‌های یهودی اشکنازی و شمال آفریقا رخ می‌دهند (۳۵، ۳۶). بر حسب مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ توسط کالوگرا و همکارانش انجام گرفته است، سه جهش L549P و L137P، fsP189 و L549P بیشتر از ۷۰ درصد آلل‌های مربوط به نیمین پیک نوع B در جمعیت ترکیه را شامل می‌شوند. جهش‌های H421Y و K576N ۸۵ درصد آلل‌های مربوط به نیمین پیک B در جمعیت عربستان سعودی را تشکیل می‌دهند. همچنین جهش‌های F480L و S379P, R441X, R479W در حدود ۵۵ درصد آلل‌های مربوط به بیماران نیمین پیک B در جمعیت پرتغالی/برزیلی را تشکیل می‌دهند و جهش A196P بیشتر از ۴۲ درصد آلل‌های بیماران مبتلا به نیمین پیک B جمعیت اسکاتلندی/انگلیسی را شامل می‌شود (۳۷).

اکثر بیماران مبتلا به نیمین پیک در کشورهای اروپای غربی و ایالات متحده آمریکا شناسایی شده‌اند؛ جایی که دسترسی به اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی راحت و سریع است؛ همچنین در

نیمین پیک یک بیماری چندگانه با طیف وسیعی از علائم بالینی است. علائم بالینی این بیماری، بسته به مقدار فعالیت باقی‌مانده آنزیم متفاوت است. انواع مختلفی از اختلالات مولکولی و تفاوت در علائم بالینی و فنوتیپ، در هر دو نوع نیمین پیک A و B شناخته شده است (۲، ۳۳). برآورد دقیق بروز بیماری نیمین پیک A و B در جهان ممکن نیست چون به‌طور حتم عده‌ای از بیماران نا شناخته باقی می‌مانند که این می‌تواند بدلیل در دسترس نبودن تشخیص آنزیمی و یا نداشتن آگاهی کافی پزشکان باشد. اگرچه نیمین پیک یک بیماری قومی محسوب می‌شود اما بخوبی اثبات شده که نیمین پیک نوع A با فراوانی بالا در جمعیت یهودی اشکنازی رخ می‌دهد (۳۴). سه جهش L302P, fsP330 و R496L حدود ۹۲ درصد از آلل‌های موتانت در بیماران یهودی اشکنازی با نیمین پیک A را شامل می‌شوند (۲). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد نیمین پیک نوع A و B در اقوام و جمعیت‌های مختلفی شناسایی شده

در اگزون اول، پلی مورفیسم توالی تکرارهای شش نوکلئوتیدی (3-8); P.37LA (3-8); c.108GCTGGC (3-8) در داخل ناحیه سیگنال پپتید آنزیم اسفنگومیلیناز قرار دارد. ناحیه سیگنال پپتید آنزیم اسفنگومیلیناز برخلاف ناحیه سیگنال پپتید آنزیم های دیگر که از حدود ۲۰ آمینو اسید تشکیل شده اند، از ۴۸ آمینو اسید تشکیل شده است. با وجود اینکه ناحیه سیگنال پپتید در ساختار آنزیم بالغ حضور ندارد ولی نقش بسیار مهمی در شکل گیری صحیح آنزیم بالغ و فعال دارد (۳۲، ۳۹).

وان<sup>۳</sup> و اسکاچمن<sup>۴</sup> اولین افرادی بودند که توالی تکرارهای شش نوکلئوتیدی ای را شناسایی کردند که توالی تکرارهای لوسین-آلانین را کد می کند. زمانی که ناحیه ژنومی آنزیم اسفنگومیلیناز توالی یابی شد با cDNA مربوطه به طور کامل مقایسه شد. آن ها پنج آلل با توالی تکرارهای مختلف شامل چهار، پنج، شش، هفت و نه تکرار شناسایی کردند که آلل با شش تکرار شش نوکلئوتیدی دارای بیشترین فراوانی بود و آلل هایی با پنج، هفت، چهار و نه تکرار شش نوکلئوتیدی به ترتیب دیگر فراوانی را داشتند. بنابراین تصور شد این ناحیه ممکن است ناحیه ای چندشکلی باشد. برای بررسی ماهیت این ناحیه و تعیین اینکه این توالی در ایجاد بیماری نیم پیک دخیل است یا نه، این توالی در افراد سالم و بیمار کنترل شد. فراوانی آلل ها در هر دو گروه بیماران و افراد سالم مشابه بود و نشان دهنده این موضوع بود که این توالی نمی تواند دلیلی برای ایجاد بیماری نیم پیک باشد (۴۰). طبق مطالعات انجام شده، آلل هایی با چهار و هشت تکرار شش نوکلئوتیدی، با کم ترین فراوانی و آلل هایی با پنج و شش تکرار شش نوکلئوتیدی، با بیشترین فراوانی رخ می دهند (۳۳، ۴۱).

پلی مورفیسم (3-8); P.37LA (3-8); c.108GCTGGC (3-8) در مطالعه حاضر، با تکرارهای چهار، پنج، شش و هفت تکرار شش نوکلئوتیدی رخ داد و آلل با چهار تکرار شش نوکلئوتیدی، با بیشترین فراوانی در هر دو گروه بیماران و افراد سالم مشاهده شد. وجود تفاوت چشمگیر در فراوانی آللی با چهار تکرار شش نوکلئوتیدی میان جمعیت مورد مطالعه و دیگر جمعیت های مطالعه شده، می تواند مصداقی از اثر بنیان گذار یا تمایل به ازدواج خویشاوندی در جمعیت آذربایجان باشد. آلل با چهار تکرار شش نوکلئوتیدی [4]; (3-8); P.37LA (3-8); c.108GCTGGC (3-8) با فراوانی بالا، برای اولین بار در جمعیت شمال غرب ایران مشاهده شد؛ بنابراین مطالعات بیشتر برای درک علت این فراوانی ضروری است. در مطالعه حاضر ارتباط معناداری میان پلی مورفیسم توالی

کشورهایی که نرخ بالایی از ازدواج های خویشاوندی را دارند، مانند عربستان سعودی، ترکیه و تونس (۳۷). متأسفانه در حال حاضر اندازه گیری فعالیت آنزیمی اسفنگومیلیناز در آزمایشگاه های کشور عملی نیست.

بر اساس مطالعات صورت گرفته، پی بردیم که مطالعه حاضر، اولین گزارش در ارتباط با تشخیص مولکولی بیماری نیم پیک در شمال غرب ایران است. هیچ گونه اطلاعات آماری درباره شیوع و فراوانی انواع بیماری نیم پیک در شمال غرب ایران وجود ندارد. با آنالیز توالی یابی اگزون های هفت بیمار مبتلا به نیم پیک A و B پی بردیم، جهش بدمعنی L137P در سه نفر از بیماران به صورت هموزیگوت وجود دارد. جهش L137P در اگزون دوم رخ داده و باعث جابجایی لوسین با پرولین در جایگاه ۱۳۷ آنزیم می شود. طبق مطالعات انجام شده، این جهش با فراوانی بیشتری در مبتلایان به نیم پیک نوع B و نوع خفیف تر این بیماری دیده می شود (۳۷، ۳۸). از آنجایی که علائم بالینی در بیماران دارای این جهش خفیف تر می باشد به نظر می رسد آنزیمی که در این حالت تولید می شود دارای فعالیت باقی مانده باشد (۳۸). L137P تنها جهش بیماری زای مشاهده شده در این مطالعه است. در این مطالعه فعالیت آنزیمی آنزیم اسفنگومیلیناز در بیماران به طور مستقیم مورد بررسی قرار نگرفت بنابراین نمی توان به طور قطع در مورد تأثیر جهش مشاهده شده روی فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز در جمعیت مورد مطالعه نظری داد و نیاز به مطالعات و تحقیقات وسیع تری می باشد.

در مطالعه ای که توسط سایمینارو و همکاران<sup>۱</sup> در سال ۲۰۰۲ روی ۳۹۴ نمونه بیمار از سراسر جهان و از نژادهای مختلف در نیویورک انجام شده، جهش L137P با فراوانی آللی ۳۷ درصد تنها در نژاد ترک مشاهده شده است (۳۷)؛ این نوع جهش همچنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ توسط آیکات و همکاران<sup>۲</sup> در کشور ترکیه صورت گرفت، در پنج نفر از ۱۰ بیمار مبتلا به نیم پیک مشاهده شد (۳۸). تشابه در نتایج به دست آمده در مطالعات قبلی و مطالعه حاضر، می تواند به علت تشابه جغرافیایی در دو منطقه و دو جمعیت باشد.

پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (p.V36A); c.107T>C rs1050228 که به صورت هموزیگوت در یکی از بیماران مشاهده شد، در اگزون اول رخ می دهد. در مطالعاتی که صورت گرفته هیچ کاهش چشم گیری در ارتباط با این پلی مورفیسم و فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز مشاهده نشده است (۴۵).

3. Wan

4. Schuchman

1. Simonaro et al

2. Aykut et al



استخوان و مشاهده ماکروفاژهای کف آلود اختصاصی بیماری نیم پیک و هم چنین توسط آزمون اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی اسفنگومیلیناز به درخواست پزشکان متخصص مورد تأیید قرار گرفته بود.

مطالعات گذشته نشان داده‌اند که بیماران با فنوتیپ متوسط حداقل دارای یک آلل جهش یافته می‌باشند (۴۶). اما در مطالعه حاضر تمام بیماران دارای آلل جهش یافته بیماری را نبودند و بیماران باقی مانده علیرغم دارا بودن علائم بالینی مشابه دارای فنوتیپ متفاوت و فاقد جهش‌های بیماری را بودند. دلیل عدم مشاهده موتاسیون در بقیه بیماران مورد مطالعه، ممکن است وجود جهش‌هایی در مناطق ژنی بررسی نشده باشد. با توجه به اینکه در این مطالعه بررسی محدود به نواحی اگزونی و مرز بین اگزون‌ها و اینترون‌ها بوده است بنابراین احتمال وجود جهش در مناطق اینترونی و مناطق 3'UTR یا 5'UTR منتفی نمی‌باشد و در مورد بیماران با علائم بیماری نیم پیک که فاقد جهش بیماری را می‌باشند، بررسی این نواحی ضروری می‌باشد. در عین حال امکان وجود رابطه‌ای میان پلی‌مورفیسم‌های مشاهده شده و بروز بیماری نیم پیک نیز با توجه به مطالعات گذشته به‌طور کامل رد نمی‌شود. بنابراین مطالعات با وسعت و تعداد بیماران بیشتری برای بررسی رابطه پلی‌مورفیسم‌های ذکر شده و بروز بیماری نیم پیک در جمعیت ایران و بخصوص جمعیت شمال غرب ایران نیاز می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

فراوانی و شیوع جهش‌های ژن اسفنگومیلین فسفودی استراز ۱، میان جمعیت‌های گوناگون و حتی میان افراد یک جمعیت، متفاوت است. بیماران با فنوتیپ یکسان، علائم بالینی و فنوتیپ متفاوتی را نشان می‌دهند. بنابراین ممکن است علل و فاکتورهای دیگری در بروز علائم بالینی در بیماران مبتلا به نیم پیک دخیل باشند. نبودن رابطه روشنی میان فنوتیپ/ فنوتیپ بیماران، تشخیص دقیق بیماری توسط متخصصین را دشوار می‌کند؛ بنابراین برنامه‌های غربالگری ژنتیکی، می‌تواند روش مفیدی برای شناسایی مبتلایان و حتی افرادی باشد که ممکن است در آینده از این بیماری رنج ببرند.

تکرارهای شش نوکلئوتیدی و بیماری نیم پیک نوع A و B مشاهده نشد و فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار نگرفت بنابراین نمی‌توان در مورد ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز اظهار نظر کرد. با این حال طبق مطالعات انجام‌شده، فعالیت آنزیم اسفنگومیلیناز ترشچی در افراد با فنوتیپ افراد دارای فنوتیپ c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[6]+[6] در مقایسه با افراد دارای فنوتیپ c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[5]+[5] ۵۲ درصد بیشتر است. این تفاوت در مقایسه با افراد دارای فنوتیپ c.108GCTGGC (3-8); P.37LA (3-8)[4]+[4] به ۶۶ درصد می‌رسد (۳۳، ۴۱).

c.1522; Gly508Arg rs1050239 دیگر پلی‌مورفیسم شایع در جمعیت مورد مطالعه بود. این پلی‌مورفیسم در مجاورت یک جایگاه بالقوه فسفریلاسیون قرار دارد که دارای نقشی مهم در فعالیت و ترشح آنزیم است؛ در نتیجه، این جایگزینی می‌تواند روی عملکرد جایگاه فسفریلاسیون مجاور تأثیر داشته و موجب کاهش فعالیت، ترشح و پایداری آنزیم شود (۴۲، ۴۳).

مطالعات انجام‌شده ارتباط چشمگیری بین فعالیت اسفنگومیلیناز ترشچی و پلی‌مورفیسم rs1050239 گزارش کرده‌اند. فعالیت اسفنگومیلیناز ترشچی در افراد با فنوتیپ GG دارای بیشترین مقدار، در افراد با فنوتیپ AG دارای مقدار متوسط و در افراد با فنوتیپ AA دارای کمترین مقدار است؛ از سوی دیگر، ارتباط این پلی‌مورفیسم با فعالیت اسفنگومیلیناز لیزوزومی هنوز مورد بحث بوده و رابطه آشکاری مشاهده نشده است؛ با این حال، فعالیت اسفنگومیلیناز لیزوزومی در افراد با فنوتیپ AA، در مقایسه با دو فنوتیپ دیگر، به‌طور قابل توجهی پایین است (۴۲، ۴۴).

بیماران مطالعه شده در مطالعه حاضر در محدوده سنی ۲ تا ۱۴ سال قرار داشتند و میانگین سنی آن‌ها ۷/۱۴ سال بود. سه نفر از بیماران مطالعه شده دارای آلل جهش یافته L137P؛ تنها آلل جهش یافته بیماری را مشاهده شده در این مطالعه؛ به‌صورت هموزیگوت بودند. این بیماران دارای علائم بالینی مشابهی از جمله بزرگی کبد و طحال، لکه قرمز آلبالویی در ماکولای چشم، اختلال در رشد، قد و وزن پایین و تورم شکم بودند. بیماری آن‌ها توسط اسپیراسیون مغز

deficiencies. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease, 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2001. P.3589-610.

3. McGovern MM, Schuchman EH. Acid sphingomyelinase deficiency. In: Pagon, R.A.,

### References:

1. Vanier MT. Biochemical studies in Niemann- Pick disease. I. Major Sphingolipids of liver and spleen. *Biophys Acta* 1983; 750: 178-84.
2. Schuchman EH, Desnick RJ. Niemann-Pick disease types A and B: acid sphingomyelinase

- Bird, T.D., Dolan, C.R., Stephens, K. (Eds.), GeneReviews [Internet]. 2009. University of Washington, Seattle (WA) (1993–2006 Dec 07 [updated 2009 Jun 25]).
4. Patterson MC. Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Scriver CR, et al. (Eds.). 2001. 8th ed. McGraw-Hill, New York; 2001.P. 3611–34.
  5. Millat G, Marçais C, Tomasetto C. Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1373-85.
  6. Morris JA, Zhang D, Coleman KG, et al. The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:493-8.
  7. Kanfer JN, Young OM, Shapiro D, Brady RO. The metabolism of sphingomyelin. I. Purification and properties of a sphingomyelin-cleaving enzyme from rat liver tissue. *J Biol Chem* 1996. 241:1081–4.
  8. Breen L, Morris HH, Alperin JB, Schochet SS Jr. Juvenile Niemann-Pick disease with vertical supranuclear ophthalmoplegia. *Arch Neurol* 1981; 38:388-90.
  9. Manning DJ, Price WI, Pearse RG, Fetal A. an unusual presentation of Niemann-Pick disease type C. *Arch Dis Child* 1990;3:335-6.
  10. Kelly DA, Portmann B, Mowat Ap, Sherlock S, Lake BD. Niemann-Pick disease type C: Diagnosis and outcome in children, with particular reference to live disease. *J Pediatr* 1993. 123: 242-7.
  11. Levran O, Desnick RJ, Schuchman EH. Niemann-Pick disease: A frequent missense mutation in the acid sphingomyelinase gene of Ashkenazi Jewish type A and B patients. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 3748-52.
  12. da Veiga Pereira L, Desnick RJ, Adler DA, Distèche CM, Schuchman EH. Regional assignment of the human acid sphingomyelinase gene (SMPD1) by PCR analysis of somatic cell hybrids and in situ hybridization to 11p15.1---p15.4. *Genomics*. 1991;9(2):229–34.
  13. Schuchman, E.H. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann–Pick disease. *J Inher Metab Dis* 2007; 30, 654–63.
  14. Doehner W, Bunck AC, Rauchhaus M, von Haehling S, Brunkhorst FM, Cicoira M, et al. Secretory sphingomyelinase is upregulated in chronic heart failure: A second messenger system of immune activation relates to body composition, muscular functional capacity, and peripheral blood flow. *Eur Heart J* 2007; 28:821-8.
  15. Lang PA, Schenck M, Nicolay JP, Becker JU, Kempe DS, Lupescu A, Koka S, Eisele K, Klarl BA, Rubben H, Schmid KW, Mann K, Hildenbrand S, Heftner H, Huber SM, Wieder T, Erhardt A, Haussinger D, Gulbins E, Lang F: Liver cell death and anemia in Wilson disease involve acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 2007; 13:164-70.
  16. Ion G, Fajka-Boja R, Kovács F, Szébeni G, Gombos I, Czibula A, et al. Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cell Signal* 2006;18(11):1887–96.
  17. Lee CY, Tamura T, Rabah N, Lee D-YD, Ruel I, Hafiane A, et al. Carboxyl-terminal disulfide bond of acid sphingomyelinase is critical for its secretion and enzymatic function. *Biochemistry* 2007;46(51):14969–78.
  18. Brady RO, Kanfer JN, Mock MB, Fredrickson DS. The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-pick disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 1966; 55: 366-9.
  19. Herr I, Wilhelm D, Böehler T, Angel P, Debatin KM: Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by

- ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *Embo J* 1997; 16:6200-8.
20. Spiegel S, Cu villier O, Edsall LC, Kohama T, Menzeleev R, Olah Z, et al: Sphingosine-1-phosphate in cell growth and cell death. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 845:11-8.
  21. McGovern MM, Aron A, Brodie SE, Desnick RJ, Wasserstein MP. Natural history of type A Niemann-Pick disease: possible endpoints for therapeutic trials. *Neurology* 2006; 66:228-32.
  22. Wasserstein MP, Desnick RJ, Schuchman EH. The natural history of type B Niemann-Pick disease: results from a 10-year longitudinal study. *Pediatrics* 2004; 114: e672-7.
  23. Mikati MA, Zeinieh M, Habib RA, El Hokayem J, Rahmeh A, El Sabban M, et al. Changes in sphingomyelinases, ceramide, Bax, Bcl2, and caspase-3 during and after experimental status epilepticus. *Epilepsy Res* 2008; 81:161-6.
  24. McGovern MM, Wasserstein MP, Giugliani R, Bembi B, Vanier MT, Mengel E, et al. A prospective, cross-sectional survey study of the natural history of Niemann-Pick disease type B. *Pediatrics* 2008, 122:e341-e349.
  25. Wasserstein MP, Aron A, Brodie SE, Simonaro C, Desnick RJ, McGovern MM: Acid sphingomyelinase deficiency: prevalence and characterization of an intermediate phenotype of Niemann-Pick disease. *J Pediatr* 2006, 149:554-9.
  26. Desnick JP, Kim J, He X, Wasserstein MP, Simonaro CM, Schuchman EH. Identification and characterization of eight novel SMPD1 mutations causing types A and B Niemann-Pick disease. *Mol Med* 2010;16(7-8):316-21.
  27. Rodríguez-Pascau L, Gort L, Schuchman EH, Vilageliu L, Grinberg D, Chabás A. Identification and characterization of SMPD1 mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients. *Hum Mutat* 2009; 30 (7): 1117-22.
  28. Dardis A, Zampieri S, Filocamo M, Burlina A, Bembi B, Pittis M.G. Functional in vitro characterization of 14 SMPD1 mutations identified in Italian patients affected by Niemann Pick Type B disease. *Hum. Mutat* 2005; 26, 164.
  29. Pittis MG, Ricci V, Guerci VI, Marçais C, Ciana G, Dardis A, et al. Acid sphingomyelinase: identification of nine novel mutations among Italian Niemann Pick type B patients and characterization of in vivo functional in-frame start codon. *Hum Mutat* 2004;24(2):186-7.
  30. Reichel M, Richter-Schmidinger T, Mühle C, Rhein C, Alexopoulos P, Schwab SG, et al. The common acid sphingomyelinase polymorphism G508R is associated with self-reported allergy. *Cell Physiol Biochem* 2014; 34:82-91.
  31. Ferlinz K, Hurwitz R, Vielhaber G, Suzuki K, Sandhoff K: Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. *Biochem J* 1994; 301:855-62.
  32. Hjelm LN, Chin ELH, Hegde MR, Coffee BW, Bean LJH. A simple method to confirm and size deletion, duplication, and insertion mutations detected by sequence analysis. *J Mol Diagn* 2010;12(5):607-10.
  33. Schuchman EH. The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009; 47:S48-57.
  34. Meikle P, Hopwood JJ, Clague AR, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 1999; 281 (3):249-54.
  35. Goodman RM. Genetic Disorders among the Jewish People. Johns Hopkins University Press: 1979.
  36. Vanier MT, Ferlinz K, Rousson R, Duthel S, Louisot P, Sandhoff K, et al. Deletion of arginine (608) in acid sphingomyelinase is the prevalent mutation among Niemann-Pick disease type B

- patients from northern Africa. *Hum. Genet.* 1993; 92, 325-30.
37. Simonaro CM, Desnick RJ, McGovern MM, Wasserstein MP, Schuchman EH. The demographics and distribution of type B Niemann-Pick disease: novel mutations lead to new genotype/phenotype correlations. *Am J Hum Genet* 2002;71(6):1413-9.
38. Aykut A, Karaca E, Onay H, Ucar SK, Coker M, Cogulu O, et al. Analysis of the sphingomyelin phosphodiesterase 1 gene (SMPD1) in Turkish Niemann-Pick disease patients: mutation profile and description of a novel mutation. *Gene* 2013;526(2):484-6.
39. Strom TM, TF W: DeFinetti program. 2004.
40. Wan Q, Schuchman EH. A novel polymorphism in the human acid sphingomyelinase gene due to size variation of the signal peptide region. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1270:207-10.
41. Rheina C, Reichela M, Mühle C, Rottera A, Schwaba G S, Kornhuber J. Secretion of Acid Sphingomyelinase is Affected by its Polymorphic Signal Peptide. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:1385-401.
42. Reichela M, Richter-Schmidinger T, Mühle C, Rheina C, Alexopoulou PG, Schwaba S, et al. The Common Acid Sphingomyelinase Polymorphism p.G508R is Associated with Self-Reported Allergy. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:82-91.
43. Dastani Z, Ruel IL, Engert JC, Genest J Jr, Marcil M: Sphingomyelin phosphodiesterase-1 (SMPD1) coding variants do not contribute to low levels of high-density lipoprotein cholesterol. *BMC Med Genet* 2007; 8:79.
44. He X, Chen F, Dagan A, Gatt S, Schuchman E.H. A fluorescence-based, high-performance liquid chromatographic assay to determine acid sphingomyelinase activity and diagnose types A and B Niemann-Pick disease. *Anal Biochem* 2003, 314, 116-20.
45. Rhein C, Mühle C, Kornhuber J, Reichel M. Alleged Detrimental Mutations in the SMPD1 Gene in Patients with Niemann-Pick Disease. *Int J Mol Sci* 2015;16(6):13649-52.
46. Pittis MG, Ricci V, Guerci VI, Marçais C, Ciana G, Dardis A, Gerin F, Stroppiano M, Vanier MT, Filocamo M, Bembi B: Acid sphingomyelinase: identification of nine novel mutations among Italian Niemann Pick type B patients and characterization of in vivo functional in-frame start codon. *Hum Mutat* 2004, 24:186-7.

## SPHINGOMYELINASE GENE MUTATION COMMON IN PATIENTS WITH TYPE A AND B NIEMANN PICK DISEASE IN NORTH WEST, IRAN

Elnaz Abedini<sup>1,2</sup>, Seyed Mojtaba Mohaddes Ardebili<sup>3\*</sup>, Abbas Ali Hosseinpour Feizi<sup>4</sup>

Received: 22 Dec 2015; Accepted: 19 Feb, 2016

### Abstract

**Background & Aims:** Niemann-Pick disease (NPD) types A and B are rare autosomal recessive disorders that occur due to mutations in the sphingomyelin phosphodiesterase 1 (SMPD1) gene, which result in the deficiency or shortage of lysosomal acid sphingomyelinase (ASM) activity. The disorder is characterized by the accumulation of sphingomyelin in the endolysosomal sections, and patients often present with hepatosplenomegaly, atherogenic lipid profiles, respiratory complications, and sometimes progressive neurodegeneration.

**Materials & Methods:** In this study, we report the molecular characterization of seven unrelated Iranian Azeri Turk patients with types A and B NPD by sequencing SMPD1 exons. For collecting more information about the frequency of the polymorphic hexanucleotide sequence, P.37LA (3-8), residing within the signal peptide of ASM, we also designed a control group consisting of 50 healthy participants with the same ethnic background.

**Results:** L137P missense mutation was observed in three of the seven patients in a homozygous state. Four patients were homozygous for rs1050239. In the case of P.37LA (3-8), the allele contained four hexanucleotide repeat units, the most frequent in both patients and healthy participants, followed by five, six, and seven repeats. However, five repeats were found for both cases in the ENSEMBLE and UCSC databases, whereas in the NCBI database, seven repeats are considered as a common allele.

**Conclusion:** L137P was the only pathogenic mutation found in this investigation. The existence of an allele with four repetitions with a high frequency for P.37LA (3-8) in our population can be an example of the founder effect.

**Keywords:** Niemann Pick disease, Sphingomyelin phosphodiesterase1, Acid sphingomyelinase

**Address:** Department of Medical Genetics, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**Tel:** +984133374322

**Email:** mohaddesmo@yahoo.com

SOURCE: URMIA MED J 2016; 26(12): 1053 ISSN: 1027-3727

<sup>1</sup> Department of Genetics, East Azarbaijan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

<sup>2</sup> Department of Genetics, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

<sup>3</sup> Department of Medical Genetics, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

<sup>4</sup> Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran