

تشخیص بالینی و مولکولی بیماری نیمن پیک

• دکتر صادق ولیان بروجنی

استاد ژنتیک مولکولی پزشکی، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک

svallian@sci.ui.ac.ir

• نسیم ابراهیمی

کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم

گروه زیست‌شناسی، بخش ژنتیک

چکیده

نیمن پیک (Niemann-Pick Disease, NPD)، بیماری ذخیره‌لیزوزومی با وراثت اتوزومی مغلوب است که سبب متابولیسم غیرطبیعی لیپیدها می‌گردد. این بیماری از لحاظ بالینی به چهار نوع A، B، C و D دسته‌بندی می‌شود. انواع A و B هر دو در اثر نقص در ژن SMPD1 و C و D در اثر جهش یا نقص در یکی از ژن‌های NPC1 و NPC2 کنترل‌کننده متابولیسم کلاسترول ایجاد می‌شوند. تشخیص بیماری NPD بر اساس ارزیابی بالینی و سپس آزمایش‌های بیوشیمیایی و در پایان تشخیص مولکولی است. بررسی مولکولی نیز شامل تعیین توالی، استفاده از پنل‌های چند ژنی و همچنین استفاده از روش‌های غیر مستقیم با به‌کارگیری مارکرهای چند شکلی واقع در ناحیه ژن‌های موثر در بیماری می‌باشد. در این نوشتار مروری بر معرفی بیماری نیمن پیک و تشخیص آن با تاکید بر انواع A و B صورت گرفته است.

کلمات کلیدی: اسید اسفنگومیلیناز، تشخیص مولکولی، نیمن پیک، NPC1، SMPD1، NPD

مقدمه

نیمن پیک^۱ (NPD) به گروهی از بیماری‌های ذخیره‌ای لیزوزومی با وراثت اتوزومی مغلوب اطلاق می‌شود که به صورت هتروژن است و به سبب اختلال

در روند متابولیسم اسفنگولیپیدها و یا اختلال در مسیر استریفیکاسیون و حمل و نقل کلاسترول ایجاد می‌شود. به علت ویژگی‌های بالینی و پاتولوژیکی متنوع این بیماری، افرادی که به این بیماری مبتلا هستند در دو گروه قرار می‌گیرند (۱). دسته اول بیمارانی هستند که به دلیل نقص در آنزیم اسید اسفنگومیلیناز (ASM)^۲ به این بیماری مبتلا شده‌اند و بسته به نوع و موقعیت جهش‌هایی که در ژن رمزکننده این آنزیم اتفاق می‌افتد، ممکن است به نوع A یا B آن مبتلا باشند (۲). گروه دوم (نوع C (C1)، D (C2)) دارای جهش در یکی از دو ژن رمزکننده پروتئین‌های درگیر در انتقال کلاسترول به نام‌های NPC1 و NPC2 هستند که این امر سبب تجمع درون سلولی کلاسترول می‌گردد (۳). این ژن‌ها به ترتیب در جایگاه‌های کروموزومی 18q11-q12 و 14q24.3 واقع شده‌اند (۲). نقایص ژنی NPC1 و NPC2 موجب اختلال در حمل و نقل داخل سلولی کلاسترول و دیگر لیپیدهای داخل سلول می‌شوند و تجمع غیر طبیعی کلاسترول را در بافت‌هایی نظیر مغز، استخوان، کبد و طحال را در پی دارند. طبق مطالعات انجام شده در بیماران با نیمن پیک نوع C و D اتصال و الحاق کلاسترول به لیزوزوم نرمال می‌باشد و فقط در مسیر حمل و نقل کلاسترول به شبکه اندوپلاسمی اختلال ایجاد می‌گردد (۴). این بیماران هپاتواسپلنومگالی (بزرگ شدن همزمان کبد و طحال) را به صورت خفیف

1-Niemann-Pick Disease
2- Acid sphingomyelinase



تر نسبت به نوع A و B دارند ولی سیستم عصبی مرکزی شان به طور جدی تحت تأثیر قرار گرفته است (Schuchman & Wasserstein 2015). از آنجایی که در ایران نرخ بروز نوع A و B بیماری بالاتر است، به همین جهت در این نوشتار با تأکید بر روی این گروه تنظیم شده است.

در نوع A بیماری کمبود آنزیم ASM شدیدتر است (۵٪ افراد سالم)، این در حالی است که بیماران نوع B، دارای سطح بالاتری از این آنزیم می باشند (۶۰-۱۰٪ افراد سالم). در واقع نوع A، فرم شدید بیماری می باشد و باعث تخریب سیستم عصبی می گردد. این نوع در دوران کودکی بروز می کند و باعث مرگ در ۳ سال اول زندگی می گردد. از علائم نوع A می توان به هپاتواسپلنومگالی، هایپوتونیای شدید و عقب ماندگی ذهنی - حرکتی اشاره کرد. نوع B، فرم خفیف تر و غیرعصبی بیماری NPD می باشد. این نوع معمولاً سیستم عصبی را درگیر نمی کند و فرد بیمار تا دوران بزرگسالی زنده می ماند (۵). NPD نوع C در سطح بیوشیمیایی و مولکولی شیوع بالاتری نسبت به NPD نوع A و B دارد.

نشانه‌های بالینی نیمین پیک نوع A و B

اولین گروه از بیماران نیمین پیک به دلیل نقص در آنزیم اسید اسفنگومیلیناز (ASM) می باشند و بسته به نوع و موقعیت جهش‌هایی که در ژن رمز کننده این آنزیم (SPMD1) اتفاق می افتد، ممکن است به نوع A یا B آن مبتلا باشند. نوع A (NPA)، فرم حاد و عصبی بیماری است و سبب تخریب سیستم عصبی مرکزی می گردد. اغلب این بیماران با هپاتواسپلنومگالی، اسهال و استفراغ در میانگین سن سه ماه شناسایی می شوند. بزرگ شدن کبد و طحال تا جایی ادامه می یابد که بیشتر حفره شکمی و لگنی را اشغال می کند. از دیگر علائم این نوع، زوال عصبی پیشرونده

همراه با هایپوتونیای شدید است. این بیماران به علت هایپوتونیای شدید، مک زدن ضعیف شیر و فشرده شدن معده شان نمی توانند به میزان کافی کالری مصرف کنند. در ۵۰٪ کودکان مبتلا، یک نقطه قرمز آلبالویی در ماکولای چشم شان ایجاد می گردد و در ادامه با اضافه شدن آسیب‌های نورولوژیکی و اختلالات تنفسی ناشی از عفونت‌های ریوی، در نهایت مرگ نوزاد در سه سال اول زندگی اتفاق می افتد. در مقابل بیماران نوع B (NPB)، علائم آشکاری از اختلال در سیستم عصبی مرکزی نشان نمی دهند اما هپاتواسپلنومگالی در این بیماران شدیدتر است و با نارسایی‌های کبدی همراه است. این نوع از نظر بالینی هتروژن است و سن شروع، علائم و شدت بیماری در بین بیماران متغیر می باشد. در این بیماران ریه‌هایشان نیز درگیر می شود و عملکرد ریوی آن‌ها اغلب به خطر می افتد. بیماران این نوع اغلب محدودیت رشد و تاخیر در شروع سن بلوغ دارند. از دیگر علائم رایج این بیماران، کوفتگی بدن، درد مفاصل و استخوان‌ها است که با گذشت زمان بدتر می شود.

برخی از بیماران نوع B اختلالات دیگری از قبیل خونریزی، مشکلات کبدی، پارگی طحال و بیماری‌های قلبی وابسته به عروق کرونری یا دریچه‌های قلبی دارند. در نهایت بیماران به علت مشکلات تنفسی و کبدی در بزرگسالی فوت می کنند (۱، ۲، ۶، ۷). در هر دو بیماران نوع A و B، سلول‌های اسفنجی^۱ مانند در مغز استخوان شان دیده شده است که علت اصلی درد استخوانها، مفاصل و شکستگی استخوانها در این بیماران همین است. به دلیل اختلالاتی که این بیماران در کبد و طحال‌شان دارند، اغلب دارای هماتولوژی غیرطبیعی هستند و شواهدی مبنی بر وجود لیپید در پلاسمایشان وجود دارد و همچنین درصد پلاکت خون و میزان HDL^۲ در این بیماران کاهش و میزان LDL^۳ و تری گلیسیرید افزایش می یابد (شکل ۱) (۳).

- 1- Foam cells
- 2- High-density lipoprotein
- 3- Low-density lipoprotein

آن‌ها را یهودیان اشکنازی تشکیل می‌دهند. بیماران باقی مانده مربوط به بیش از ۴۰ کشور هستند که اغلب آن‌ها مربوط به آمریکای شمالی و اروپای غربی هستند. در این بین آسیا کمترین تعداد را به خود اختصاص داد (۲). در مطالعه‌ای که به منظور تخمین نرخ بروز بیماری‌های ذخیره لیزوزومی از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۷ در ایران (تهران) انجام شد، فقط ۳۱ نفر در این ۱۰ سال به بیماری‌های ذخیره لیزوزومی مبتلا شدند که در بین این بیماری‌ها، نیمین پیک بیشترین تعداد را به خودش اختصاص داد (۱۱ نفر) (۱۲).



شکل ۱- کودکان مبتلا به نیمین پیک نوع A و B: شکل a و b به ترتیب کودکان مبتلا به NPA و NPB را نشان می‌دهد که حاکی از صورت نسبتاً درشت و شکم ورم کرده آن‌ها است (۸).

جدول ۱- ۱۰ موتاسیون شایع جهان در ژن SMPD1

| موتاسیونهای شایع در جهان | جمعیت مورد بررسی |
|--------------------------|-------------------------------------|
| p.R610del | جزایر قناری، آفریقای شمالی، اسپانیا |
| p.W32X | ایتالیا |
| p.F333SfsX52 | یهودیان اشکنازی |
| p.L304P | یهودیان اشکنازی |
| p.R498L | یهودیان اشکنازی |
| p.H423Y | عربستان سعودی |
| p.R3AfsX76 | چین |
| p.H284SfsX7 | چین |
| p.R3AfsX76 | چین |
| p.A484E | اسپانیا |

ایدیومولوژی

نیمین پیک به عنوان یک بیماری اتوزوم مغلوب نادر شناخته شده است و اطلاعات محدودی در مورد جمعیت و بروز آن موجود می‌باشد. چندین مطالعه نرخ شیوع نوع A و B را حدود ۱ در هر ۱۵۰۰۰۰ تولد زنده تخمین زده‌اند (۹، ۱). با این حال تخمین صحیح میزان بروز بیماری به اطلاعات حاصل از آزمایشگاه‌هایی که تست‌های بیوشیمیایی افراد مشکوک را انجام می‌دهند بستگی دارد و نسبت به غربالگری جمعیت از درجه اطمینان بالاتری برخوردار است. تنها جمعیتی که غربالگری مبتنی بر DNA برای NPD حاصل از نقص ASM انجام دادند، جمعیت یهودیان اشکنازی بود که فراوانی ناقلین ۳ موتاسیون خاص مسبب NPD نوع A را بین ۱:۹۰ تا ۱:۱۲۰ نفر تخمین زدند. در جدول ۱ لیستی از ۱۰ موتاسیون شایع در جهان آورده شده است (۱۰). در مجموع این شواهد نرخ بروز این فرم از ناهنجاری را بین یهودیان اشکنازی حدود ۲ تا ۳ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر پیشنهاد می‌کند (۱۱، ۳). در حال حاضر به منظور بررسی موتاسیون‌ها، اطلاعات جمعیتی حدود ۱۰۰۰ نفر در دانشکده پزشکی Mount Sinai وجود دارد. حدود ۳۰۰ نفر از این بیماران به نوع A مبتلا هستند که ۶۰٪

ژنتیک مولکولی

نوع A و B بیماری NPD به علت جهش‌هایی که در ژن رمزکننده ASM به نام اسفنگومیلین فسفودی استراز (sphingomyelin phosphodiesterase 1, SMPD1) رخ می‌دهند، بروز می‌کنند. اولین تلاش برای شناسایی توالی ژن SMPD1 در سال ۱۹۸۹ انجام شد. با توجه به نتایج، جایگاه ژن SMPD1 که طول آن در حدود 5kb می‌باشد را در کروموزوم ۱۱ و ناحیه p15.1-p15.4 تعیین کردند (شکل ۲) (۱۳).

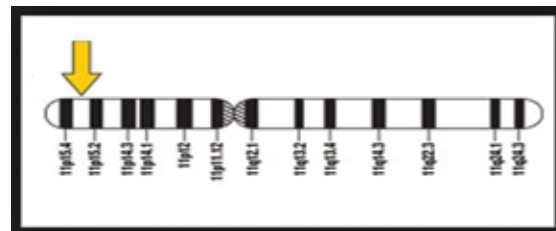


در لیزوزوم تولید می شود. این آنزیم نقش مهمی در تنظیم متابولیسمی فعالیت زیستی اسفنگولیپیدها، تمایز سلولی، پاسخ های ایمنی و التهابی، آپوپتوز، نقل و انتقال بین سلولی کلاسترول و متابولیسم ایفا می کند (۱۵، ۱۴). ASM به سرعت از لیزوزوم به قسمت بیرونی غشای پلاسمایی منتقل می شود و در آنجا اسفنگومیلین را به سرامید تبدیل می کند که این باعث سازماندهی مجدد میکرو دومین های غشایی یا ساختارهای قایق مانند می شود و رویدادهای سیگنالینگ پایین دست را تحریک می کند (۱۵، ۲).

شایان ذکر است که SMPD1 در ناحیه مهر شده (ایمپرینت)^۱ ژنوم انسان واقع شده است و مطالعات اخیر نشان داده است که بیان این ژن ترجیحا از کروموزوم به ارث رسیده از مادر صورت می گیرد (۱۵، ۲).

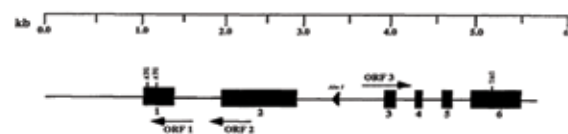
مکانیسم مولکولی

اولین بیمار مبتلا به بیماری نیم پیک نوع A در سال ۱۹۱۴ مورد توصیف قرار گرفت و در سال ۱۹۳۰ مشخص شد که لپید تجمع یافته در بافت آن ها اسفنگومیلین می باشد. اما امروزه مشخص شده است که علاوه بر اسفنگومیلین، سایر چربی ها مانند کلاسترول و گانگلیوزید نیز در بافت های این بیماران تجمع می یابد که منجر به ایجاد ناهنجاری هایی در عملکرد سلول می شود. بسیاری از یافته های بالینی در بیماران نیم پیک به احتمال زیاد مرتبط با تجمع لپیدها در لیزوزوم ها و اندوزوم ها می باشد که باعث اختلال در عملکرد آن ها می شود. تجمع اسفنگومیلین در سیستم عصبی مرکزی از جمله cerebellum منجر به ناهماهنگی حرکتی^۲، نارسا گویی^۳ و اشکال در بلع^۴ می شود. علاوه بر مغز، تجمع لپیدها در طحال، کبد، ریه و مغز استخوان نیز مشاهده می شود که می تواند در عملکرد هریک از آن ها اختلالاتی ایجاد کند. با این حال همانطور که در پیش تر نیز توضیح داده شد، آنزیم ASM در شکل گیری طبیعی غشا و عملکرد آن نیز نقش دارد. بنابراین، اختلالات غشایی نیز



شکل ۲- موقعیت کروموزومی ژن SMPD1 انسانی
ژن SMPD1 در انسان بر روی کروموزوم ۱۱ و ناحیه p15.1-p15.4 واقع شده است

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>) در سال ۱۹۹۲ ساختار ژن SMPD1 مشخص شد. براین اساس مشخص شد که ژن SMPD1 متشکل از ۶ اگزون می باشد که کوتاه ترین اگزون آن ۷۷ جفت باز و بلندترین آن ۷۷۳ جفت باز است و همچنین دارای ۵ اینترون می باشد که طول آن ها از ۱۵۳ تا ۱۰۵۹ جفت باز متغیر است (شکل ۳) (۱۳).



شکل ۳- نمای شماتیک ژن SMPD1 انسان

جعبه های سیاه و خطوط مستقیم به ترتیب بیانگر اگزون ها و اینترون ها هستند. دو کدون آغازین و اولین کدون پایانی که در فریم می باشند نیز مشخص شده اند. موقعیت سه ORF احتمالی دیگر علاوه بر ORF اصلی تولید کننده پروتئین و جهت رونویسی با فلش ها مشخص شده اند (۱۳).

این ژن دارای قالب باز خواندن (ORF, open reading frame) به طول ۱۸۹۰ جفت باز بوده که پروتئین ASM که شامل ۶۲۹ اسید آمینه می باشد را رمز می نماید. ASM گلیکوپروتئینی است که برش هیدرولیتیک اسفنگومیلین را کاتالیز می کند که در نتیجه این برش فسفوکولین و سرامید

- 1- Imprinted
- 2- Ataxia
- 3- Slurring of speech
- 4- Dysphagia

جدول ۲- لیست موتاسیونهای گزارش شده در ژن SMPD1 در ایران

| منبع | موتاسیون |
|------|------------------|
| (۱۹) | p.N385K |
| (۱۹) | p.V36A |
| (۱۹) | c.1417-1418delCT |
| (۱۹) | p.A487V |
| (۱۹) | c.1033-1034insT |
| (۱۹) | c.573del T |
| (۱) | c.740delG |
| (۲۰) | p.L137P |

تشخیص بیماری نیمین پیک نوع A و B

الف) تشخیص بالینی

اولین روش دقیق تشخیص بالینی بیماری نیمین پیک، بررسی سیستم رتیکولواندوتلیال، به خصوص مغز استخوان، کبد و طحال با استفاده از میکروسکوپ الکترونی است که چنانچه سلول های اسفنجی (کف آلود) مشاهده شود نشان از نیمین پیک دارد. CT-SCN مغزی نیز کوچک شدن مغز در این بیماران را نشان می دهد (بخصوص نوع A) (۱۷, ۱۸). روش تشخیصی دیگر روشی بیوشیمیایی بر مبنای سنجش فعالیت آنزیم ASM می باشد که در افراد مبتلا کمتر از ۱۰٪ افراد کنترل می باشد. با این وجود فعالیت باقی مانده در سلول های سفید خون بیشتر است. سنجش فعالیت اسفنگومیلیناز با روش های *in vitro* در لوکوسیت ها، بافت ها یا سلول های کشت شده با استفاده از سوبستراهای طبیعی (اسفنگومیلین که جز کولین آن با مواد رادیواکتیو نشاندار شده است) انجام می شود. به طور کلی فیبروبلاست پوستی دارای بیشترین فعالیت ASM طبیعی است و پایدارترین و قابل اعتمادترین منبع برای تایید فقدان عملکرد آنزیمی در افراد مبتلا به NPD است. البته گزارش ها حاکی از این است که در سال های اخیر به دلیل فقدان اختصاصیت برخی از سوبستراهای صناعی تجاری تشخیص

ممکن است در روند بیماری زایی نقش ایفا کند. از طرف دیگر داده های به دست آمده از موش های knockout نیز حاکی از دخالت ASM در مسیرهای پیام رسانی سلولی است و بنابراین نقص در عملکرد این آنزیم می تواند سبب اختلال در مسیرهای پیام رسانی شود. به عنوان مثال در کودکانی که کمبود ASM دارند، اختلالات رشدی دیده می شود که این به سبب اختلال در مسیر سیگنالینگ IGF-1 می باشد. به این ترتیب نقص در ASM می تواند با تاثیرگذاری بر متابولیسم لیپیدی، عملکرد غشای سلولی و مسیرهای پیام رسانی سلولی در روند بیماری زایی نیمین پیک دخالت داشته باشد (۱۶, ۱۵, ۳).

نیمین پیک در ایران

اولین مورد این بیماری در سال ۲۰۰۴ توسط مجتهدزاده و همکارانش گزارش شد. بیمار کودکی ۴ ماهه بود که به علت بیقراری و وجود توده شکمی در بخش اطفال بیمارستان بوعلی سینا ساری بستری شد و سپس با توجه به علائم بالینی موجود در بیمار و آزمایش های پاراکلینیک انجام شده تشخیص نهایی نیمین پیک نوع A بود (۱۷). در همان زمان معتمدی و همکارانش نیز یک مورد NPB گزارش کردند و دوره بالینی بیمار را توصیف نمودند (۱۸). گروهی نیز یک مطالعه ۱۰ ساله روی بیوپسی کبد در مرکز پزشکی کودکان در تهران به منظور تخمین نرخ بیماری های ذخیره ای انجام دادند و متوجه شدند در بین بیماری های ذخیره ای، بیشترین میزان بروز را نیمین پیک دارد (۱۲). گله داری و همکارانش در سال ۲۰۱۳ یک حذف گزارش نشده از اسید آمینه گوانین (c.740delG) در اگزون ۲ ژن SMPD1 گزارش کردند که در نهایت منجر به ایجاد یک کدون پایان زودرس و پروتئین کوتاه شده می شد و سبب بروز NPD نوع A می گشت (۱). منشادی و همکارانش نیز ۶ موتاسیون رایج را در ایران شناسایی کردند که لیست آن ها در جدول ۲ آورده شده است (۱۹). عابدینی و همکاران نیز جهش بیماری زا p.L137P را در جمعیت شمال غرب ایران در ژن SMPD1 گزارش کردند (۲۰).

1- Insulin-like growth factor 1



برخی از بیماران از قلم افتاده است. بنابراین، آزمایشگاه‌ها باید روش مورد استفاده خود را ارزیابی نمایند و پزشکان باید در نهایت دوباره بیمار را بر اساس سابقه خانوادگی بیماری NPA/B مورد بررسی قرار دهند (۲۱).

برای تشخیص پیش از تولد، سنجش اسفنگومیلیناز در اکثر موارد روش انتخابی است، زیرا بر روی نمونه‌های پرزهای کوریونیک بدون کشت قابل انجام است و به سرعت نیز جواب آن حاضر می‌شود. فعالیت اختصاصی آنزیم به طور قابل توجهی در نمونه‌های ویلوس کوریونی^۱ و یا سلول‌های مایع آمنیوتیک کشت شده بیشتر است اما استفاده از این منابع زیستی، جواب آزمایش را حداقل به میزان ۳ هفته به تاخیر می‌اندازد (۲۱، ۲۲).

ب) تشخیص مولکولی بررسی مستقیم:

بررسی جهش‌ها بر روی نمونه‌های ویلوس کوریونی کشت نشده برای تشخیص پیش از تولد مناسب است به خصوص در جمعیت‌هایی مانند یهودیان اشکنازی، آفریقای شمالی و صرب‌ها که آلل‌های جهش یافته شایعی دارند. حسن روش‌های تشخیص مولکولی این است که آزمایشگاه‌های

زیادی وجود دارد که تجربه تشخیص مولکولی دارند اما تعداد کمی آزمایشگاه در تشخیص اسفنگومیلیناز مهارت دارند. در تشخیص پیش از تولد با روش‌های مولکولی ضروری است خطای آلودگی با نمونه مادری مورد توجه قرار گیرد روش‌های آزمایش مولکولی برای تشخیص بیماری NPA/B شامل تست تک ژنی و استفاده از پنل چند ژنی می‌باشد. تست تک ژنی برای افرادی به کار می‌رود که در جمعیت‌هایی می‌باشند که در آن نوع‌های بیماری زای شایعی از SMPD1 وجود دارد. به عنوان مثال افرادی که اشکنازی هستند و دارای بیماری شدید تحلیل رونده عصبی می‌باشند. همینطور افرادی از شمال آفریقا، یا شیلی، عربستان سعودی و ترکیه را شامل می‌شود. در این شرایط ابتدا بررسی هدفمند با روش‌هایی مانند ارزیابی نواری (Strip assay) یا روش میکروارایه APEX تعداد زیادی جهش به طور همزمان مورد بررسی قرار می‌گیرد. اگر این بررسی هدفمند قادر به شناسایی هر دو نوع بیماری‌زا نبود، توالی یابی کامل ژن SMPD1 در این افراد روش نهایی می‌باشد (۲۱). در جدول شماره ۳ لیستی از پرایمرها جهت تعیین توالی آگزون‌های ژن SMPD1 آورده شده است (۲۳).

جدول ۳- لیستی از پرایمرها جهت تعیین توالی آگزون‌های ژن SMPD1

| آگزون | توالی نوکلئوتیدی پرایمر 5'>3' |
|-------|--|
| ۱ | TGA CAG CCG CCC GCC ACC GAG AGA CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCC ATC AGG GAT GCA TT |
| ۲ | TC CTC TGC TCT GCC TCT GAT TTC TCA CCA T CAG GAA ACA GCT ATG ACA ATC AGA GAC AAT GCC CCAGGT TCC CTT CT |
| ۲ | CAG GAA ACA GCT ATG ACT CCT CTG CTC TGC CTC TGATTT CTC ACC AT AAT CAG AGA CAA TGC CCC AGG TTC CCT TCT |
| ۳ | CCC AGC ACA GGA GGA CCA GGA TTG GAA |
| ۴ و | CAG GAA ACA GCT ATG ACG GGA CAA CAG GGA TGG TGAGAT GCT CA |
| ۵ | TCT CAC CAT CCC TGT TGT CCC ATG ' |
| ۶ و | CAG GAA ACA GCT ATG ACG CTT TTT CAC CCT TTC CTACAT CAA GAA CT |

1- Chorionic villus sampling

پنل چند ژنی معمولا شامل ژن SMPD1 و چند ژن دیگر می باشد که ممکن است برای تشخیص تفکیکی بین بیماری های لیزوزومی که علائم مشابه هم دارند در آزمایشگاه در نظر گرفته شوند. جدول ۴ خلاصه ای از تست های ژنتیک مولکولی برای نقص اسید اسفنگومیلیناز را نشان می دهد (۲۴، ۲۱).

جدول ۴- تست های ژنتیک مولکولی در شناسایی جهش های ژن SMPD1

| ژن | روش مورد استفاده | نسبت پروبند های مبتلا به نوع های بیماریزا که با این روش قابل شناسایی هستند |
|-------|-----------------------------------|--|
| SMPD1 | ارزیابی نواری یا میکروارایه | ۹۰٪ |
| | توالی یابی | >۹۵٪ |
| | بررسی هدفمند حذف یا مضاعف شدگی ژن | نامعلوم |

بررسی غیر مستقیم توسط پیوستگی

تا کنون بیش از ۱۲۰ جهش مرتبط با بیماری NPD

شناسایی شده است و تعداد جهش هایی که منجر به این بیماری می شوند به طور مداوم در حال افزایش می باشند. یافته ها نشان می دهد که بررسی مستقیم جهش ها به دلیل تنوع زیاد جهش ها و نیاز به تجزیه و تحلیل حدود ۵ کیلو جفت باز توالی ژنومی، یک فرآیند پرهزینه و زمان بر خواهد بود. بنابراین امروزه از روش هایی با عملکرد بالا برای تشخیص ژنتیکی این بیماری استفاده می شود. بررسی غیرمستقیم جهش ها از طریق بررسی پیوستگی مارکرهای چند شکلی روش انتخابی برای تشخیص ژنتیکی بیماری می باشد. در روش غیرمستقیم هر چه تعداد مارکرهای گویا بیشتر باشد، اطمینان بیشتری حاصل می شود (۲۵).

بر همین اساس اخیرا در یکی از مطالعات انجام شده بر روی تعدادی از مارکرهای واقع در ناحیه ژنی SMPD1 چند شکلی تک نوکلئوتیدی rs1542705 را به عنوان اولین نشانگر آگاهی دهنده در تشخیص مولکولی بیماری اولین نشانگر آگاهی دهنده در تشخیص مولکولی بیماری نیمن پیک با استفاده از تحلیل پیوستگی در جمعیت ایران معرفی شد (۲۶). در ادامه این مطالعه تعداد بیشتری مارکر چند شکلی در جمعیت ایران مورد شناسایی قرار گرفته اند (مطالعات منتشر نشده مولفین). جدول شماره ۵ نیز تعدادی از پلی مورفیسم های چند نوکلئوتیدی شناسایی شده در جمعیت ایران نشان داده شده است.



جدول ۵- مارکرهای چند شکلی واقع در ناحیه ژنی **SMPD1** در جمعیت ایران

| روش مورد استفاده | توالی نوکلئوتیدی پرایمر | نشانهگر |
|------------------|--|------------|
| ARMS PCR | 5'- CTTCATTGAGGGCAACCACTCCT-3'(FO) 5'-' AGGGAGGGCCAGGAGCAGTA-3' (RO) 5-' AAAAGCCTGGTGC GGCAATAC-3' (RN.G) 5-' AAAAAGCCTGGTGC GGCAATAG-3' (RN.C) | rs1050239 |
| RFLP | 5'-TCCTGGAGTTGGTGGGATAG-3'(F) 5'-GGTATGTTTGCCTGGGTCAG-3' (R) | rs1050239 |
| RFLP | 5'-AGTAGTCGACATGGGCAGGATGTGTGG-3 '(F) 5'-AGTAGTGTGCACTTGCCTGGTTGAACCAC AGC-3' (R) | rs1050239 |
| ARMS PCR | 5-' TGGGCCTGATAATTTAAAGGGG-3' (FO) 5-'CAGAGGGCGAAGGGAAAGTTT-3 '(RO) 5-' TGTTTGACGAGTGCTTCTGATGA-3' (RN.T) 5-'TGTTTGACGAGTGCTTCTGATGG-3' (RN.C) | rs1542705 |
| ARMS PCR | 5-' TTAATCCTGGTGAGTGAGGCA -3' (FO) 5-' GTGGCCCTTATGGTAGAGAAAC -3' (RO) 5-' AGGACCACGTGAGAGCTACC -3' (RN.G) 5-' AGGACCACGTGAGAGCTACT -3' (RN.C) | rs67992843 |
| RFLP | 5'-AGGGCTGGCTAGGGTCCAG-3' (FO) 5'-AGCCCCAGCACTCCTTTTCG-3' (RO) | rs1050228 |

References

- 1- Galehdari H, Tangestani R, Ghasemian S. New single nucleotide deletion in the *SMPD1* gene causes niemann pick disease type A in a child from Southwest Iran: a case report. *Iranian journal of pediatrics*. 2013;23(2):233.
- 2- Schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann-Pick disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2015;29(2):237-47.
- 3- Wasserstein MP, Desnick RJ, Schuchman EH. Types A and B Niemann-Pick Disease. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide*. 2012:80-6.
- 4- Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, et al. Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature medicine*. 2008;14(11):1247-55.
- 5- 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.
- 6- Vanier M. Niemann-Pick diseases. *Handbook of clinical neurology*. 2012;113:1717-21.

- 7- Elder DE, Ferrell LD, Kakar S. *Liver pathology*: Demos Medical Publishing; 2011.
- 8- Ranganath P, Matta D, Bhavani GS, Wangnekar S, Jain JMN, Verma IC, et al. Spectrum of SMPD1 mutations in Asian-Indian patients with acid sphingomyelinase (ASM)-deficient Niemann–Pick disease. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2016.
- 9- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama*. 1999;281(3):249-54.
- 10- Zampieri S, Filocamo M, Pianta A, Lualdi S, Gort L, Coll MJ, et al. SMPD1 mutation update: database and comprehensive analysis of published and novel variants. *Human mutation*. 2016;37(2):139-47.
- 11- Obstetricians ACo, Gynecologists. Preconception and prenatal carrier screening for genetic diseases in individuals of Eastern European Jewish descent. ACOG Committee Opinion no. 442. *Obstet Gynecol*. 2009;114(4):950-3.
- 12- Farzaneh M, Maryam M, Soroush S, Mandana A, Fatemeh M. Liver Storage Disease in Iran: A Ten Year Study of Liver Biopsies in Children Medical Center Hospital in Tehran-Iran. *Hepatitis monthly*. 2011;2011(8, Aug):652-5.
- 13- Schuchman EH, Levran O, Pereira LV, Desnick RJ. Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics*. 1992;12(2):197-205.
- 14- Ion G, Fajka-Boja R, Kovács F, Szebeni G, Gombos I, Czibula Á, et al. Acid sphingomyelinase mediated release of ceramide is essential to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis by galectin-1. *Cellular signalling*. 2006;18(11):1887-96.
- 15- Schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann-Pick Disease. *Pediatric endocrinology reviews: PER*. 2016;13:674.
- 16- Smith EL, Schuchman EH. The unexpected role of acid sphingomyelinase in cell death and the pathophysiology of common diseases. *The FASEB journal*. 2008;22(10):3419-31.
- 17- Mojtahedzadeh F, Qasemi M. Niemann Pick type A, a case report. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2006;16(53):112-8.
- 18- Kalantar-Motamedi M, Khoddami M, Naseri M. Type B Niemann-Pick Disease: report OF A CASE with miliary pattern On chest X-ray. *Archives of Iranian Medicine*. 2005;8(3):223-5.
- 19- Manshadi MD, Kamalidehghan B, Keshavarzi F, Aryani O, Dadgar S, Arastehkani A, et al. Four novel p. N385K, p. V36A, c. 1033–1034insT and c. 1417–1418delCT mutations in the sphingomyelin phosphodiesterase 1 (SMPD1) gene in patients with types A and B Niemann-Pick disease (NPD). *International journal of molecular sciences*. 2015;16(4):6668-76.
- 20- Abedini E, Mohaddes Ardebili SM, Hosseinpour Feizi AA. SPHINGOMYELINASE GENE MUTATION COMMON IN PATIENTS WITH TYPE A AND B NIEMANN PICK DISEASE IN NORTH WEST, IRAN. *URMIA MEDICAL JOURNAL*. 2016;26(12):1041-53.
- 21- Vanier MT. Prenatal diagnosis of Niemann–Pick diseases types A, B and C. *Prenatal diagnosis*. 2002;22(7):630-2.
- 22- He X, Chen F, Dagan A, Gatt S, Schuchman EH. A fluorescence-based, high-performance liquid chromatographic assay to determine acid sphingomyelinase activity and diagnose types A and B Niemann–Pick disease. *Analytical biochemistry*. 2003;314(1):116-20.
- 23- Sikora J, Pavlu-Pereira H, Elleder M, Roelofs H, Wevers R. Seven Novel Acid Sphingomyelinase Gene Mutations in Niemann-Pick Type A and B Patients. *Annals of human genetics*. 2003;67(1):63-70.
- 24- Acid Sphingomyelinase Deficiency [Internet]. National Center for Biotechnology Information. 2006.
- 25- Pomares E, Marfany G, Brión MJ, Carracedo A, González-Duarte R. Novel high-throughput SNP genotyping cosegregation analysis for genetic diagnosis of autosomal recessive retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Human mutation*. 2007;28(5):511-6.
- 26- Ebrahimi N, Vallian Borujeni S. Analysis of Genetic Variation of rs1542705 Marker in SMPD1 Gene Region as an Informative Marker for Molecular Diagnosis of Niemann-Pick Disease in Isfahan Population. *Arak University of Medical Sciences Journal*. 2016;19(6):1-10.

