

بررسی ژن NAIP در مبتلایان به بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی در منطقه‌ی آذربایجان شرقی طی سال‌های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۴

*دکتر مرتضی جبارپور بنیادی^۱، حسین نداف نیا^۲، دکتر محمد برزگر^۳، دکتر هرمز ایرملو^۴، دکتر رضا خندقی^۵

دکتر محمد امین بخش^۶، محمد شیمیا^۷، امید عمرانی^۷

*نویسنده‌ی مسئول: دانشگاه تبریز، گروه ژنتیک، bonyadim@tbzmed.ac.ir

خلاصه

سابقه و هدف: بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی یک گروه از اختلالات ماهیچه‌ای - عصبی ارثی است که با تحلیل نورون‌های حرکتی نخاع همراه بوده و سبب ضعف عضلانی می‌گردد. یکی از ژن‌هایی که مانع از مرگ نورون حرکتی می‌شود ژن NAIP می‌باشد. حذف شدگی این ژن معمولاً در بیماران تیپ I این بیماری دیده می‌شود. این مطالعه با هدف بررسی فرکانس و نقش بیماری‌زایی این ژن در مبتلایان به آتروفی عضلانی - نخاعی در منطقه‌ی آذربایجان شرقی در سال‌های ۱۳۸۳ و ۱۳۸۴ بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: این مطالعه‌ی توصیفی بر روی ۵۰ فرد مبتلا به بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی انجام شد. DNA آنان استخراج و بررسی ژنتیک مولکولی بر روی نمونه‌ها صورت گرفت. آگزون‌های ۵ و ۱۳ ژن NAIP و ریزماهورای D5S1416 در این نمونه‌ها با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) چندانگانه تکثیر یافته و محصول بر روی ژل آگارز و ژل پلی‌آکریل آمید با استفاده از رنگ آمیزی‌های اتیدیدوم برآمید و نیتترات نقره به ترتیب الکتروفورز گردید و مورد بررسی مولکولی قرار گرفت. فراوانی تیپ‌های مختلف بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی دارای حذف شدگی ژن NAIP محاسبه گردید. جهت تعیین ارتباط بین جنس و شدت بیماری، از آزمون کای دو استفاده گردید.

یافته‌ها: از ۵۰ بیمار مبتلا به آتروفی عضلانی - نخاعی، ۲۸ درصد حذف شدگی در ژن NAIP را نشان دادند که همه‌ی نمونه‌ها متعلق به تیپ I بیماری بودند و شدت بیماری در آن‌ها شدیدترین وضعیت را داشت. ۹ نفر (۶۴ درصد) از مبتلایان که در آن‌ها ژن مورد مطالعه حذف شده بود، محصول ازدواج فامیلی بودند. شدت بیماری در بیماران تیپ I فاقد ژن NAIP در مقایسه با بیماران تیپ I دارای ژن سالم خیلی بیشتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: در ۲۸ درصد از مبتلایان، حذف شدگی ژن NAIP مشاهده شد. ازدواج فامیلی یکی از عوامل افزایش دهنده‌ی خالص شدگی جهش ژنی و تولد نوزادان مبتلا در جامعه مورد بررسی می‌باشد. توصیه می‌گردد خانواده‌هایی که در آن‌ها بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی مشاهده شده است، جهت تشخیص قبل از تولد به مراکز تشخیص ژنتیک مولکولی مراجعه نموده و اقوام نزدیک این افراد از ازدواج خویشاوندی خودداری نمایند.

واژگان کلیدی: NAIP، PCR، چندانگانه، ریزماهور

تاریخ دریافت : ۸۳/۸/۲۸

تاریخ پذیرش : ۸۴/۳/۳۰

-
- ^۱ متخصص ژنتیک پزشکی - مولکولی، استادیار دانشگاه تبریز، مرکز تحقیقات کاربرد دارویی
^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه تبریز
^۳ فوق تخصص مغز و اعصاب کودکان، دانشیار تیم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
^۴ متخصص مغز و اعصاب، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز
^۵ متخصص مغز و اعصاب، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تبریز
^۶ متخصص ژنتیک، دانشیار دانشگاه تبریز
^۷ کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه تبریز

مقدمه

بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی (SMA)^۱ دارای الگوی توارثی اتوزوم مغلوب (AR)^۲ می‌باشد که در اثر تخریب نورون‌های حرکتی در سلول‌های شاخ قدامی نخاع و پایه‌ی مغز پدیدار می‌شود. میزان شیوع این بیماری ۱ در ۱۰۰۰۰ تولد و فراوانی ناقلین به آن ۱ در ۴۰ الی ۶۰ است (۳-۱). این بیماری از حذف شدگی اگزون‌هایی از ژن‌های SMN، NAIP^۳ و P44 عارض می‌شود. جایگاه کروموزومی لوکوس‌های ژن‌های مذکور بر روی بازوی بلند کروموزوم ۵ (5q13) بوده و تمام این ژن‌ها دارای نسخه‌های تلومریک و سانترومریک هستند (۶-۴). ژن SMN دارای نسخه‌های تلومریک (SMN1) و سانترومریک (SMN2) است. این دو نسخه شباهت ساختمانی زیادی با یکدیگر داشته و تفاوت آن‌ها در پنج جفت باز در اگزون‌های ۷ و ۸ و ایترون‌ها است. ژن NAIP علاوه بر نسخه‌ی تلومریک، دارای چندین نسخه‌ی (حدود ۲ الی ۵ نسخه) ژن کاذب^۴ در سمت سانترومری است. کپی‌های کاذب از ژن مذکور (Ψ NAIP) فاقد دو اگزون کد کننده‌ی ۵ و ۶ می‌باشند (۷). در مورد ژن P44 گزارشات کمی وجود دارد. این ژن زیر واحد فاکتور رونویسی TFIIH را کد می‌کند. ژن TFIIH در رونویسی، ترمیم DNA و کنترل چرخه‌ی سلولی نقش دارد (۹-۸). بر اساس علایم بالینی، بیماری SMA به چهار گروه عمده تقسیم بندی می‌گردد (۹):

تیپ یک بیماری SMA، از نظر عارضه‌ی بالینی شدیدترین نوع بوده و سن بروز بیماری از زمان تولد تا ۶ ماهگی است. نوزادان مبتلا به این نوع بیماری، بدون محافظ قادر به نشستن نبوده و معمولاً تا ۲ سالگی فوت می‌کنند. این تیپ بیماری SMA، بیماری وردینگ - هافمن^۵ نیز نامیده می‌شود.

شدت بیماری تیپ II کمتر از تیپ یک است. سن بروز بیماری در این مبتلایان بین ۶ تا ۲۴ ماهگی بوده و نوزادان مبتلا قادر به نشستن بوده ولی بدون کمک قادر به ایستادن و یا راه رفتن نیستند. این مبتلایان عموماً بعد از ۲ سالگی فوت می‌کنند.

سن بروز تیپ III بیماری بعد از ۱۸ ماهگی است. در این افراد هیپرتروفی عضلانی ساق پا و رعشه‌ی دست‌ها و هم‌چنین عدم تعادل در راه رفتن (تلو تلو خوردن) مشاهده می‌گردد. این تیپ از بیماری، بیماری ولاندر - کالبرگ^۶ نیز نامیده می‌شود.

تیپ IV بیماری SMA در بزرگسالی بروز می‌کند (بعد از سنین ۳۰ سالگی). در این مبتلایان ضعف عضلانی در ماهیچه‌های بازو و ران و هیپرتروفی کاذب ماهیچه‌های ساق پا مشاهده می‌شود. علایم بالینی بیماری گاهی اوقات با بیماری دیستروفی عضلانی دوشن^۷ (DMD) اشتباه گرفته می‌شود (۹).

در تمام تیپ‌های SMA امکان کاهش در سرعت هدایت نورون حرکتی وجود دارد ولی هدایت نورون حسی همیشه طبیعی می‌باشد. در اکثر بیماران مبتلا به SMA، ژن SMN1 متحمل حذف شدگی گردیده است. حذف شدگی ژن NAIP در درصد کمی از این مبتلایان مشاهده شده و این حذف شدگی بیشتر در بین بیماران تیپ I است (۷، ۹، ۸، ۱۰، ۱۳). نقش ژن NAIP در بیماری‌زایی SMA به طور کامل مشخص نیست ولی آزمایشات مختلف نشان داده که ژن NAIP روی تمایز و بقای سلول‌های عصبی که دارای نورون‌های حرکتی می‌باشند اثر می‌گذارد (۱۶-۱۴). بنابراین رابطه‌ی کاملاً نزدیکی بین NAIP و میزان تخریب نورون‌ها در مبتلایان به SMA گزارش شده است (۱۷، ۱۸). بر اساس این

^۵ Werdnig-Hoffman^۶ Kugelberg-Welander^۷ Duchenne Muscular Dystrophy^۱ Spinal Muscular Atrophy^۲ Autosomal Recessive^۳ Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein^۴ Pseudogene

و پاراکلینیکی نظیر الکترومیوگرافی بیماران و سابقه‌ی فامیلی صورت پذیرفت. بیماران مورد بررسی و تشخیص مولکولی قرار گرفتند. در ابتدا به میزان ۵ سی سی خون از نمونه‌های پژوهش تهیه و به منظور جلوگیری از لخته شدن خون به میزان ۲۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر از اتیلن دی آمین تترا استیک اسید نیم مولار (EDTA) (نیم مولار) به خون اضافه و سپس خون در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگه‌داری گردید.

استخراج DNA از خون محیطی طبق روش فنل - کلروفرم و با کیت استخراج DNA (DNA Purification Kit - سیناژن) صورت پذیرفت. روش استخراج DNA از خون کامل با استفاده از فنل - کلروفرم به طریق ذیل انجام پذیرفت:

دو سی سی از خون کامل با نمونه‌گیر مخصوص (سمپلر) برداشته و در لوله‌های شیشه‌ای ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. جهت لیز کردن سلول‌های گلبول‌های قرمز، ۶ میلی‌لیتر بافر لیز کننده^{۱۰} (۱۵۲ میلی‌مول کلرید آمونیوم و ۱۰ میلی‌مول بیکرینات سدیم و ۰/۱ میلی‌مول EDTA) به آن اضافه و مخلوط گردید. سر لوله‌ها با پارافیلیم بسته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از بیرون آوردن نمونه‌ها از یخچال، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ (دور در دقیقه) سانتریفوژ شد. مایع رویی را با پیپت حباب‌دار بیرون ریخته و دوباره ۶ میلی‌لیتر بافر لیز کننده اضافه کرده و با پارافیلیم بسته و تکان داده تا رسوب جدا شود. این مراحل تا زمانی تکرار گردید که رسوب حاصله سفید رنگ شده و فاقد گلبول‌های قرمز باشد. هم حجم خون اولیه بافر SE^{۱۱} (۱۷۵ میلی‌مول کلرید سدیم، ۶ میلی‌مول EDTA، PH بین ۸ تا ۸/۳) اضافه نموده و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سدیم دو دسیل سولفات (SDS)^{۱۲} ۱۰ درصد و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰

یافته‌ها ژن NAIP به عنوان یک عامل تعدیل کننده^۸ در بیماری‌زایی SMA نقش دارد، ولی مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا نقش عملکردی آن را ثابت کند.

گروهی از محققان با استفاده از تکنیک الکتروفورز با جریان متناوب^۹ گزارش دادند که در بیماران تیپ یک، ژن NAIP به طور هم‌زمان با ژن SMN1 حذف می‌شود (۱۹). در این بررسی گزارش شد که حضور ژن NAIP با افزایش تعداد کپی‌های SMN در بیماران SMA تیپ یک همراه است و حضور ژن NAIP با افزایش تعداد کل کپی‌های ژن SMN2 و یا ثابت نگه‌داشتن تعداد کل کپی‌های ژن SMN در بیماران تیپ II و III توأم شده است. بنابراین حذف ژن NAIP با شدت بالینی بیماری SMA رابطه‌ی مستقیمی دارد.

نظر به این‌که ژن‌های مختلفی در بروز و شدت بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی دخالت دارند، ژن NAIP به طور معمول در بیماران آتروفی عضلانی - نخاعی تیپ یک به همراه ژن SMN1 حذف شده و باعث تشدید علائم بالینی می‌گردد. از این رو هدف اصلی مطالعه‌ی حاضر تعیین فراوانی مبتلایانی است که در آن‌ها ژن NAIP متحمل حذف شدگی گردیده، بر حسب تیپ بیماری در سال ۱۳۸۴ در منطقه‌ی آذربایجان شرقی می‌باشد و با عنایت به این‌که در منطقه‌ی مورد بررسی (استان آذربایجان شرقی) اطلاعات کامل و جامعی از فراوانی تیپ‌های مختلف بیماری آتروفی عضلانی - نخاعی وجود ندارد، این مطالعه می‌تواند اطلاعات ارزشمندی ارائه نماید.

مواد و روش‌ها

این مطالعه‌ی توصیفی بر روی ۵۰ بیمار مبتلا به SMA در منطقه‌ی آذربایجان شرقی انجام شد. تشخیص بالینی توسط متخصصین اعصاب و کودکان تبریز بر اساس آزمایشات بالینی

^{۱۰} Lyses buffer

^{۱۱} Salin - EDTA

^{۱۲} Sodium Dodecyle Sulfat

^۸ Modifier

^۹ Pulsed Field Gel Electrophoresis

میلی گرم در میلی لیتر) اضافه کرده و به مدت ۱۲ ساعت

جدول ۱ - توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر اگزون‌های ۵ و ۱۳ ژن NAIP و ریزماهواره‌ی D5S1416 و طول محصولات

حاصل از PCR

اگزون مورد مطالعه	جهت	توالی پرایمرها	محصول PCR (جفت باز = bp*)
اگزون ۵	F R	5'-AAAGCCTCTGACGAGAGGATC-3' 5'-CTCTCAGCCTGCTCTTCAGAT-3'	۴۳۵
اگزون ۱۳	F R	5'-CCAGCTCCTAGAGAAAGAAGGA-3' 5'-ATGCTTTGATCTCTAGAATGG-3'	۲۱۳
ریزماهواره (D5S1416)	F R	5'-GCGTTTCGCTACAGGCCAGATGA-3' 5'-CAGGGGAAAATAGGCTTGTGAA-3'	۱۴۰

* bp= base pair

در بیماری ۳۷ الی ۴۵ درجه‌ی سانتی گراد گذاشته شد.

پس از این مرحله با استفاده از محلول فنل - کلروفرم، پروتئین محلول جدا گردید. به این منظور هم حجم خون اولیه، محلول فنل - کلروفرم به محلول حاصله اضافه و کاملاً مخلوط شد. سپس در سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شده و محلول فاز بالایی که حاوی DNA و عاری از پروتئین بوده در یک لوله‌ی آزمایش شیشه‌ای جمع آوری شد. دو برابر حجم این محلول، اتانول سرد ۱۰۰ درصد اضافه شد که در نتیجه DNA آن به صورت کلاف از محلول خارج شد. کلاف DNA حاصله در اتانول ۷۰ درصد سرد شسته و سپس در مقدار کافی از بافر TE^{۱۳} و یا آب مقطر اتوکلاو شده، حل گردیده و جهت مشخص شدن میزان جذب (OD)^{۱۴} مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA از خون با کیت (سیناژن)، مطابق روشی که کمپانی سازنده ارایه داده بود، صورت پذیرفت.

غلظت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتوفوتومتری (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) سنجیده شد. غلظت مناسب DNA برای PCR حدود ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بوده که از این محلول DNA حدود ۲ میکرولیتر استفاده گردید. حذف شدگی ژن NAIP با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)^{۱۵} چندانگانه بررسی شد. برای این منظور از دستگاه PCR اپندورف استفاده گردید. برای بررسی ژن NAIP، اگزون‌های ۵ و ۱۳ از این ژن توسط تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول (۱)، طبق روش اشاره شده توسط روی^{۱۶} و همکاران (۷) تکثیر و مورد مطالعه قرار گرفتند. پرایمر ریزماهواره (D5S1416) به عنوان کنترل دوم داخلی برای اطمینان بیشتر از عملکرد روش PCR چندانگانه مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها و طول محصول PCR در جدول (۱) ذکر شده است.

جدول ۲ - مواد و غلظت مورد استفاده از آن‌ها جهت انجام PCR چندانگانه برای تکثیر اگزون‌های ۵، ۱۳ ژن NAIP و ریزماهواره

مواد کیت	غلظت اولیه	غلظت مناسب برای PCR	مقدار مورد نیاز برای حجم ۵۰ میلی لیتر (میلی لیتر)
کلوروفورم	۵۰ (میلی مول)	۱/۵ (میلی مول)	۱/۵
دزوکسی نوکلئوید تری فسفات	۱۰ (میلی مول)	۰/۲ (میلی مول)	۱
بافر PCR	۱۰X	۱X	۵
آنزیم تک (Taq سیناژن)	۵ (واحد در میکرولیتر)	۱ (واحد)	۰/۲

جدول ۳- توزیع فراوانی مبتلایان به آتروفی عضلانی - نخاعی بر حسب تیپ بیماری، جنسیت بیماران و وضعیت حذف شدگی ژن NAIP در منطقه‌ی آذربایجان شرقی، ۱۳۸۴

وضعیت ژن NAIP	حذف شدگی		فاقد حذف شدگی		جمع
	پسر	دختر	پسر	دختر	
تیپ I	۹	۶	۵	۵	۲۵
تیپ II	-	-	۳	۵	۸
تیپ III	-	-	۹	۱۰	۱۹

با توجه به متفاوت بودن اندازه‌ی باندها و عدم مکمل بودن توالی پرایمرها و نزدیک بودن شرایط PCR، امکان انجام PCR چندگانه مساعد گردیده بود.

برای انجام تکنیک PCR، مواد مورد نیاز عبارت بود از: کلرومینیوم (MgCl₂)، دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)، بافر PCR (۵۰۰ میلی مول کلرید پتاسیم با ۲۰۰ میلی مول Tris-HCl، pH ۸/۴، dH₂O، Taq polymerase (سیناژن) و پرایمرها (MWG-Biotech). در این پروژه، حجم نهایی مخلوط PCR، ۵۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد که طبق جدول (۲) مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام PCR چندگانه جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر از دستگاه PCR کمپانی اپندرف و از برنامه‌ی ذیل استفاده گردید:

جهت جدا شدن کامل دو رشته‌ی DNA از یکدیگر، برنامه‌ی ترموسیکل با ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه آغاز شد. سپس ۳۰ چرخه از برنامه، ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت پذیرفت. آخرین چرخه نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد خاتمه یافت. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی گردید.

در مواردی که باند مربوط به اگزون ۵، حذف شدگی نشان داده بود؛ جهت اطمینان بیشتر، محصول PCR بر روی پلی‌اکریلامید ۸ درصد الکتروفورز گردیده و توسط روش

نیرات نقره رنگ‌آمیزی و مطالعه شد. جهت بررسی رابطه‌ی جنس و شدت بیماری از آزمون آماری کای دو استفاده گردید. $P < ۰/۰۵$ به عنوان تفاوت معنی دار محسوب گردید.

یافته‌ها

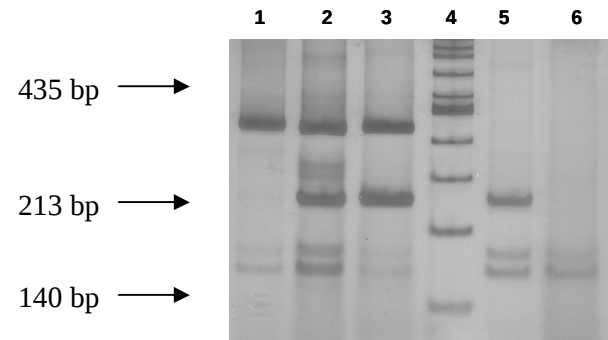
از ۵۰ بیمار مشکوک به بیماری آتروفی عضلانی نخاعی ۲۵ نفر (۵۰ درصد) مبتلا به تیپ I، ۸ نفر مبتلا به تیپ II (۱۶ درصد) و ۱۷ نفر (۳۴ درصد) مبتلا به تیپ III بیماری بودند (جدول ۳). افراد مبتلا به تیپ I از این بیماری، در سنین بین ۲ ماهگی الی ۲ سالگی قرار گرفته بودند. مبتلایان به تیپ II بیماری، بین سنین ۲ الی ۸ سالگی بوده و مبتلایان به تیپ سه بین سنین ۲۰ الی ۳۰ سالگی قرار گرفته بودند.

در مجموع ۱۴ نفر (۲۸ درصد) حذف شدگی در اگزون ۵ ژن NAIP را نشان دادند. طول باندهای مورد نظر برای اگزون ۵، اگزون ۱۳ و ریزماهواره به ترتیب ۴۳۵، ۲۱۳ و ۱۴۰ جفت باز (bp) می‌باشد، که عدم مشاهده‌ی باند اگزون ۵ نشانگر حذف شدگی ژن NAIP بود (شکل ۱). همه حذف شدگی‌ها متعلق به مبتلایان به تیپ I بودند و در بین مبتلایان به نوع II و III هیچ‌گونه حذف شدگی در ژن مورد نظر مشاهده نگردید. رابطه‌ی بین شدت بیماری و حذف شدگی ژن NAIP از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$). از این ۱۴ مورد، ۹ مورد (۶۴ درصد) محصول ازدواج فامیلی بوده و اکثر آن‌ها قبل از ۲ سالگی فوت نمودند. تعداد پسران مبتلا به SMA که

بحث

نتایج حاصل از تحقیق نشان داد ۲۸ درصد از بیماران دارای حذف شدگی ژن NAIP بودند که همه‌ی آن‌ها متعلق به تیپ I بیماری بودند. کیم و همکارانش با بررسی روی ۸۷ بیمار SMA برزیلی به این نتیجه دست یافته بودند که در ۳۵ درصد از بیماران تیپ I و ۱۶ درصد بیماران تیپ II و ۲/۴ درصد بیماران تیپ III حذف شدگی اگزون ۵ ژن NAIP دیده می‌شود (۲). در مطالعاتی که توسط بارلت و همکارانش انجام گرفت میزان حذف شدگی ژن NAIP در بیماران SMA تیپ I در حدود ۶۶ درصد، در تیپ II ۶/۵ درصد و در تیپ III ۱۳ درصد گزارش شد (۲۰). در گزارشات رودریگز و همکارانش، فرکانس حذف شدگی ژن NAIP در تیپ I ۶۶ درصد، در تیپ II ۱۰ درصد، و در تیپ III ۱۲ درصد ذکر شده است (۲۱). در مطالعه‌ای بر روی ۴۸ بیمار چینی، نشان داده شد که ۱۱ درصد در تیپ I و ۲۵ درصد در تیپ II و ۱۲ درصد در تیپ III بوده‌اند (۲۲). میزان حذف شدگی ژن NAIP در جمعیت‌های مختلف بین صفر تا ۶۷/۹ درصد متغیر است (۱۲، ۲۱، ۲۲، ۲۳). بنابراین بر اساس مطالعاتی که در جمعیت‌های مختلف صورت پذیرفته، حذف شدگی ژن NAIP در بین مبتلایان به تیپ یک SMA بیشتر از مبتلایان به تیپ‌های II و III است. بررسی مولکولی ما روی ۵۰ بیمار SMA از منطقه‌ی مورد مطالعه در کشور نشان می‌دهد که ژن NAIP در ۲۸ درصد از مبتلایان به SMA متحمل حذف شدگی گردیده است. این حذف شدگی تنها در بین مبتلایان به نوع یک بیماری مشاهده گردید. بر اساس علایم بالینی و پاراکلینیکی از ۵۰ بیمار ارجاعی، ۲۵ نفر مبتلا به تیپ یک، ۸ مبتلا به تیپ دو و ۱۷ مبتلا به تیپ سه بیماری تشخیص داده شده بودند. بنابراین، ۶۴ درصد از مبتلایان به نوع یک بیماری SMA در منطقه‌ی مورد مطالعه، حذف شدگی ژن NAIP را نشان داده‌اند. در تمام موارد، حذف شدگی ژن NAIP مقارن با افزایش شدت و کاهش سن بروز بیماری در بین مبتلایان بوده است به صورتی که اکثر این مبتلایان در ۶ الی ۹ ماه اول

حذف شدگی ژن NAIP در آن‌ها مشاهده گردیده بود، ۹ نفر (۶۴ درصد) و بقیه (۶ نفر) دختر بودند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0/05$).



شکل ۱ - مطالعه‌ی مولکولی ژن NAIP توسط PCR چندگانه که بر روی ژل پلی‌اکریلامید الکتروفورز شده و با نیترات نقره رنگ آمیزی شده است.

در این شکل باند ۴۳۵ جفت باز (bp) مربوط به اگزون ۵، باند ۲۱۳ bp متعلق به اگزون ۱۳ و باند ۱۴۰ bp، ریزماهواره‌ی D5S1416 می‌باشد. حذف اگزون ۵ نشان دهنده‌ی حذف شدگی ژن NAIP است. اگزون ۱۳ و ریزماهواره به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار می‌گیرند. خط دو، کنترل مثبت پروژ است که باندهای مربوط به اگزون ۵، ۱۳ و ریزماهواره در آن قابل مشاهده هستند. در خط پنج، باند مربوط به اگزون ۵ حذف شده است که این مورد دچار حذف شدگی ژن NAIP گردیده است. در خط یک، باند مربوط به اگزون ۱۳ حذف شده است ولی باندهای ۵ و ریزماهواره‌ای کاملاً آشکار است. همان طوری که در این مورد مشاهده گردید، گاهی اوقات اگزون ۱۳ تکثیر نشده که جهت اطمینان بیشتر از عملکرد PCR از ریزماهواره D5S1416 استفاده گردید. در خط آخر، باندهای اگزون ۵ و ۱۳ حذف شده ولی باند ریزماهواره‌ای مشخص است که این مورد هم دچار حذف شدگی ژن NAIP است. در خط سه، باند ریزماهواره‌ای خیلی ضعیف دیده می‌شود ولی کنترل داخلی دیگر (باند اگزون ۱۳) به خوبی مشاهده می‌شود. در خط چهار، مرکز وزن مولکولی قرار گرفته که توسط آن اندازه باندها قابل شناسایی شود.

دیگر نیز مشمول این قضیه می‌باشد.

در بین نوزادان مبتلا به تیپ یک که ژن NAIP در آن‌ها متحمل حذف شدگی گردیده بود و علائم بالینی با شدت بالا مشاهده می‌گردید، ۶۴ درصد پسر بوده و ۳۶ درصد دختر بودند. تفاوت مشاهده شده بین این دو گروه معنی دار نبوده که با نتایج برخی از پژوهش‌ها مغایرت داشت (۲۶). در پژوهش مذکور مشاهده شده بود که دختران مبتلایی که در آن‌ها ژن NAIP متحمل حذف شدگی شده بود، علائم بالینی خیلی شدیدتری از پسران داشتند (۲۶). ولی در این بررسی در منطقه‌ی آذربایجان شرقی، هیچ تفاوت معنی داری در شدت بروز بیماری و جنسیت مبتلایان مشاهده نگردید. البته لازم به ذکر است که در پژوهش قبلی نیز علت مشاهده‌ی تفاوت معنی دار بین شدت علائم بالینی در دختران و پسران مبتلا به طور قطعی مشخص نشده و تا به حال هیچ گزارش مشابهی از مناطق دیگر ارائه نشده است.

تشکر و قدردانی

به این وسیله مولفین از ریاست محترم و دیگر همکاران مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی و دانشکده‌ی علوم طبیعی دانشگاه تبریز و تیم پژوهشی بیماری‌های کودکان تبریز (دانشگاه علوم پزشکی تبریز) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

تولد در اثر مشکلات ریوی فوت می‌کردند. بر این اساس می‌توان به این نتیجه رسید که در جمعیت مورد مطالعه حذف شدگی ژن NAIP با شدت بیماری رابطه مستقیم دارد.

اگرچه تیلور و همکارانش با بررسی روی بیماران تیپ I گزارش دادند که هیچ گونه تفاوتی در سن بروز بیماری و طول عمر بیماران تیپ I که دارای ژن NAIP یا فاقد ژن NAIP می‌باشند وجود ندارد (۲۴) اما نتایج به دست آمده در این مطالعه که با بعضی از مطالعات قبلی (۲۵) مطابقت دارد، نمایانگر این است که مبتلایان به تیپ یک که در آن‌ها ژن NAIP متحمل حذف شدگی گردیده در مقایسه با دیگر مبتلایان به تیپ یک که حاوی ژن سالم NAIP هستند، عملکرد دستگاه تنفسی سریع‌تر از بین رفته و شدت بیماری شدیدتر و سن بروز بیماری پایین‌تر بوده است.

از ۱۴ نفر مورد مطالعه که متحمل حذف شدگی ژن NAIP گردیده بودند، ۶۴ درصد محصول ازدواج فامیلی بودند. بقیه این افراد اکثراً محصول ازدواج‌هایی بودند که والدین آن‌ها متعلق به یک منطقه‌ی خاص و کوچک (روستاها) بوده که این نشانگر تاثیر فاکتور بنیان‌گذاری^{۱۷} در خلوص ژن‌های معیوب اتوزوم مغلوب است. تفاوت‌های مشاهده شده در بین گزارشات کشورهای مختلف نظیر برزیل، عربستان سعودی و ویتنام معمول بوده و به احتمال زیاد ناشی از اثر بنیان‌گذاری و وجود تفاوت در زمینه‌ی ژنتیکی جمعیت مورد بررسی است. تفاوت‌های مشاهده شده در بین این گزارش و گزارشات

منابع

- 1- Nguyen DB, Sadewa AH, Takeshima Y, et al. Detection of the SMN1 and NAIP genes in Vietnamese patients with spinal muscular atrophy. *Kobe J Med Sci* 2003;49(3-4):55-8.
- 2 - Kim CA, Passos-Bueno MR, Marie SK, et al. Clinical and Molecular analysis of Spinal Muscular atrophy in Brazilian Patients. *Gene & Mol Bio* 1999; 22(4): 487-92.
- 3- Zilfalil BA, Zabidi-Hussin AM, Watihayati MS, et al. Analysis of the survival motor neuron and neuronal apoptosis inhibitory protein genes in Malay patients with Spinal Muscular Atrophy. *Med J Malaysia* 2004; 59(4):512-4.
- 4- Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, et al. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy

^{۱۷} Founder Effect

to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 1990; 344:540-41.

5- Melki J, Sheth P, Abdelhak S, et al. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-14. *Lancet* 1990; 336:271-3.

6 - Melki J, Abdelhak S, Sheth P, et al. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 1990; 344:767-8.

7 - Roy N, Mahadevan MS, McLean M, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; 80:167-78.

8 - Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, et al. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associate deletions. *Hum Mol Genet* 1997; 6:229-36.

9 - Bürglen L, Seroz T, Miniou P, et al. The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet* 1997; 60:72-9.

10- Bouhouche A, Benomar A, Birouk N, et al. High incidence of SMN1 gene deletion in Moroccan adult-onset spinal muscular atrophy patients. *J Neurol* 2003; 250(10):1209-13.

11- Haider MZ, Moosa A, Dalal H, Habib Y, Reynold L. Gene deletion patterns in spinal muscular atrophy patients with different clinical phenotypes. *J Biomed Sci* 2001; 8:191-6.

12- Saitoh M, Sakakihara Y, Kobayashi S, Hayashi Y, Yanagisawa M. Correlation between deletion patterns of SMN and NAIP genes and the clinical features of spinal muscular atrophy in Japanese patients. *Acta Paediatr Jpn* 1997; 39:584-9.

13- Velasco E, Valero C, Valero A, Moreno F, Hernández-Chico C. Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype. *Hum Mol Genet* 1996; 5:257-63.

14- Götz R, Karch C, Digby MR, Troppmair J, Rapp UR, Sendtner M. The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC cells. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2479-89.

15- Liston P, Roy R, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; 379:349-53.

16- Mercer EA, Korhonen L, Skoglösa Y, Olsson PA, Kukkonen JP, Lindholm D. NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and independent pathways. *EMBO J* 2000; 19:3597-607.

17- Pari G, Berrada F, Verge G, Karpati G, Nalbantoglu J. Immunolocalization of NAIP in the human brain and spinal cord. *Neuro Report* 2000; 2:9-14.

18- Xu DG, Korneluk RG, Tamai K, et al. Distribution of neuronal apoptosis inhibitory protein-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *J Comp Neuro* 1997; 382:247-59.

19- Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: Implication for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1997; 61:40-50.

20- Burlet P, Bürglen L, Clermont O, et al. Large scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 1996; 33: 281-3.

21- Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, et al. Gene deletions in spinal muscular atrophy. *J Med Genet* 1996; 33: 93-6.

- 22- Chang JG, Jong YJ, Huang JM, et al. Molecular basis of spinal muscular atrophy in Chinese. *Am J Hum Genet* 1995; 57: 1503-5.
- 23- Al-Jumah M, Majumdar R, Al-Rajeh S, et al. Molecular analysis of the spinal muscular atrophy and neuronal apoptosis inhibitory protein genes in Saudi patients with spinal muscular atrophy. *Saudi Med J* 2003; 24(10):1052-4.
- 24 - Taylor JE, Thomas NH, Lewis CM, Abbs SJ, Rodrigues NR, Davies KE, Mathew CG. Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet* 1998; 6:467-74.
- 25- Akutsu T, Nishio H, Sumino K, et al. Molecular Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Contribution of the NAIP Gene to Clinical Severity. *Kobe J Med Sci* 2002; 48:25-31.
- 26- Novelli G, Semprini S, Capon F, Dallapiccola. B A possible role of NAIP gene deletions in sex-related spinal muscular atrophy phenotype variation. *Neurogenetics* 1997; 1:29-30.