بررسی فراوانی آللی و ژنوتیپی نشانگر rs67992843 واقع در ناحیه ژنی *SMPD1* مرتبط با بیماری نیمن پیک در جمعیت اصفهان

نسیم ابراهیمی[1]، صادق ولیان بروجنی[1*]

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم ، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۵ تاریخ پذیرش:۹۵/۵/۲۳

چکیده

مقدمه: بیماری نیمن پیک Niemann-Pick Disease (NPD) یک بیماری ذخیره ی لیپیدی با وراثت اتوزومی مغلوب است. این بیماری اساسا به دلیل نقص در ژن *SMPD1* (11p15.4) که رمزکننده ی آنزیم اسید اسفنگو میلیناز Acid sphingomyelinase (ASM) می‌باشد، بروز می‌یابد. نقص در این آنزیم منجر به تجمع اسفنگو میلین در مغز و کبد می‌شود، که نتیجه‌ی آن اختلال در عملکرد یا آسیب این دو بافت است. نشانگر های چندشکلی مانند چند شکلی های تک نوکلئوتیدی (SNP) Single Nucleotide Polymorphismدر تشخیص مولکولی بیماری های ژنتیکی از طریق بررسی پیوستگی یا نقشه یابی همو زیگوسیتی استفاده می شوند. فراوانی آللی و درجه ی هترو زیگوسیتی یک نشانگر معمولا وابسته به جمعیت است. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی آللی و درجه ی هترو زیگوسیتی نشانگر rs67992843 واقع در ناحیه ژن *SMPD1* در جمعیت ایرانی بود. این نشانگر از نوع SNP بوده و دارای دو آلل C/G می‌باشد.

مواد و روش ها: تعداد ۱۱۳ فرد سالم غیر خویشاوند برای انجام این مطالعه انتخاب گردیدند شانگر rs67992843 با استفاده از تکنیک ARMS PCR و طراحی پرایمر های جدید بر اساس این تکنیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار تحت وب Genepop و نرم‌افزار Powermarker جهت تعیین فراوانی آللی و هترو زیگوسیتی، وجود تعادل هاردی- واینبرگ و محتوای اطلاعاتی چند شکلی Polymorphic Information Content (PIC)، تحت آنالیز های آماری قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: آنالیز اطلاعات به دست آمده نشان داد که در جمعیت ایرانی فراوانی آلل مغلوب این نشانگر (آلل C) برابر ۳۱/۴۲٪ می باشد. هم چنین درجه‌ی هترو زیگوسیتی و PIC این نشانگر به ترتیب ۳۹/۸۲٪ و ۰/۳۳۸ محاسبه گردید.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که می توان از نشانگر rs67992843 برای آنالیز پیوستگی و تشخیص مولکولی ژن *SMPD1* در ارتباط با بیماری NPD استفاده نمود.

واژه های کلیدی: چند شکلی تک نوکلئوتیدی، بیماری نیمن پیک، ASM، *SMPD1* ، جمعیت ایرانی

* **نویسنده مسئول** : گروه زیست شناسی، دانشکده علوم ، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

Email: svallian@sci.ui.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

مقدمه

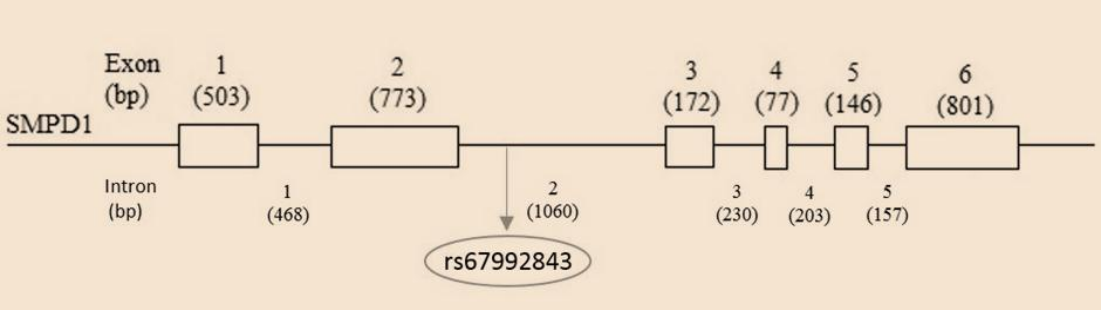
بیماری نیمن پیک (NPD) به گروهی هتروژن از بیماری های ذخیره‌ی لیزوزومی اطلاق می شود که دارای وراثت اتوزومی مغلوب بوده و سبب متابولیسم غیر طبیعی لیپید ها می‌گردد (۳-۱). این بیماری دارای چندین تیپ مختلف بوده که در دو گروه تقسیم بندی می شوند (۴). گروه اول دارای کمبود کامل یا جزئی آنزیم اسید اسفنگو میلیناز (Acid sphingomyelinase (ASM می باشند و افرادی که در این گروه قرار می گیرند به تیپ A یا B این بیماری مبتلا هستند. کمبود آنزیم ASM در تیپ A بیماری شدید تر است (۵٪ افراد سالم)، این در حالی است که بیماران تیپ B، دارای سطح بالا تری از این آنزیم می باشند (۶۰-۱۰٪ افراد سالم) (۵). تیپ A بیماری NPD، فرم حاد و عصبی بیماری است. علائم این تیپ اندکی بعد از تولد ظاهر می شود که می‌توان به هپاتو اسپلنو مگالی، زوال عصبی و هایپو تونیای شدید اشاره کرد. احتمال تشخیص لکه ی قرمز آلبالویی در بررسی های فیزیو لوژیکی نیز وجود دارد. در ادامه با اضافه شدن آسیب های نورو لوژیکی، در نهایت مرگ نوزاد در سه سال اول زندگی اتفاق می افتد. این در حالی است که تیپ B این بیماری، فرم خفیف تر و غیرعصبی بیماری NPD می باشد. علائم این تیپ ممکن است در نوزادی، کودکی و یا بزرگ سالی بروز یابد. هر چند علامت مشخص این تیپ اسپلنو مگالی و هپاتو اسپلنو مگالی می‌باشد، اما علائم دیگری از جمله ناراحتی های ریوی، تغییرات چشمی و سر درد نیز در افراد مبتلا گزارش شده است (۶, ۴, ۲). گروه دوم دارای جهش در یکی از دو ژن رمز کننده پروتئین های درگیر در انتقال کلسترول به نام های *NPC1* و *NPC2* هستند که این امر سبب تجمع درون سلولی کلسترول می گردد (۳). افراد مبتلا به تیپ C و D بیماری NPD، در این گروه قرار می گیرند (۷). اطلاعات محدودی در مورد میزان بروز و فراوانی بیماری NPD در جمعیت های مختلف وجود دارد. تیپ A بیماری در میان یهودیان اشکنازی رایج تر است و در این جمعیت نرخ بروز NPD، ۲ تا ۳ مبتلا در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است. تیپ B بیماری اغلب در آمریکای شمالی و اروپای غربی رایج است (۷, ۳). در کل گزارش شده که شیوع این بیماری ۱ نفر در هر ۱۵۰۰۰۰ تولد زنده است (۲).

جهش در ژن اسفنگو میلین فسفو دی استراز (Sphingomyelin Phospho Diesterase 1 *SMPD1*)) که رمزکننده ی آنزیم ASM است، سبب NPD تیپ A و B می گردد. این ژن در ناحیه کروموزومی 11p15.4 واقع شده است (۷)و اندازه آن ۴۵۸۵ جفت باز بوده و دارای ۶ اگزون و ۹۴۱ پلی - مورفیسم تک نوکلئوتید (Single nucleotide polymorphism, SNP) می‌باشد (۱). آنزیم ASM که محصول این ژن است دارای ۶۲۹ اسید آمینه بوده و نقش آن برش هیدرو لیتیک اسفنگو میلین و تبدیل آن به فسفو کولین و سرآمید می‌باشد (۷, ۳). تاکنون بیش از ۱۲۰ موتاسیون مختلف در ژن *SMPD1* گزارش شده است که سبب NPD تیپ A و B می گردند. این موتاسیون ها شامل هر گونه تغییر و تبدیل از جمله جهش های نقطه ای (بد معنی و بی معنی)، حذف‌های کوچک و اختلالات پیرایش هستند (۷). با توجه به تعداد بالای جهش های مرتبط با ژن *SMPD1* و بروز بیماری نیمن پیک، پر هزینه و وقت گیر بودن بررسی مستقیم جهش ها و نا مشخص بودن طیف جهش های شایع ایرانی، بررسی نشانگر های چند شکلی در آنالیز پیوستگی می تواند راه مناسبی جهت بررسی مولکولی بیماری در جمعیت ارائه نماید. این نشانگر ها بر حسب این که در داخل و یا خارج ژن واقع شده باشند و با توجه به درجه هترو زیگوسیتی آن ها، دارای ارزش تشخیصی متفاوتی هستند (۸). نشانگر های چند شکلی از لحاظ فراوانی آللی و درجه هترو زیگوسیتی، وابسته به جمعیت می باشند (۹). بنا بر این قبل از استفاده از نشانگر ها در تشخیص مولکولی بیماری های ژنتیکی، لازم است فراوانی آللی و درجه هترو زیگوسیتی آن ها در جمعیت مورد مطالعه بررسی شود (۸). معرفی نشانگر های گویا می تواند در مطالعه مولکولی بیماری نیمن پیک با روش غیر مستقیم در جمعیت ایرانی کمک موثری نماید. در روش غیر مستقیم مجموعه ای از چند شکلی های ژنومی به عنوان نشانگرهای ژنتیکی، برای تعیین ارتباط یک ناحیه ی ژنومی خاص با بیماری مورد نظر به کار می روند (۹). چند شکلی های تک

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

نوکلئوتیدی (single nucleotide polymorphism, SNP)، از جمله نشانگرهای مورد استفاده در روش غیر مستقیم می‌باشند. این نشانگر ها به دلیل داشتن ویژگی هایی مانند فراوانی بالا و پایداری بیش‌تر در جمعیت، به عنوان نشانگر های برگزیده در مطالعات آنالیز پیوستگی، جایگزین سایر نشانگر ها از جمله (STR) Short Tandem Repeat و Variable Number Tandem Repeat (VNTR) شده اند (۱۰). همان - طوری که گفته شد از آن جایی که در بیش‌تر مواقع جمعیت های مختلف از نظر نوع و هم چنین فراوانی جهش های شایع بیماری زا با یک‌دیگر متفاوت اند، به همین دلیل به منظور غربال‌گری بهینه ی جهش ها با روش غیرمستقیم، نشانگر های مورد استفاده در هر جمعیت باید به طور اختصاصی مورد بررسی قرار گیرند و نشانگر های آگاهی دهنده در آن جمعیت به طور جداگانه معرفی گردند (۹). تا کنون در جمعیت ایران مطالعه‌ای جهت بررسی نشانگرهای آگاهی دهنده‌ی مرتبط با ژن *SMPD1* انجام نگرفته است. بنا بر این در این مطالعه ویژگی های نشانگر rs67992843 در جمعیت اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. این نشانگر از نوع SNP بوده که در ناحیه ی اینترون ۲ این ژن قرار گرفته است و دارای دو آلل G/C می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- شمایی از ژن SMPD1 به همراه موقعیت نسبی اگزون ها و اینتروون های این ژن و جایگاه نشانگر rs67992843 که در ناحیه ی اینترون ۲ این ژن قرار گرفته است.

نتایج حاصل از این مطالعه از یک سو می تواند با مشخص نموده این نشانگر به عنوان یک نشانگر آگاهی دهنده، جهت تشخیص مولکولی بیماری نیمن پیک در جمعیت ایران کمک نماید و از سوی دیگر در ایجاد بانک اطلاعاتی نشانگر های ژنی جمعیت ایرانی مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها:

نمونه گیری و استخراج DNA: با توجه به این که در مطالعات مربوط به عدم تعادل پیوستگی نمونه ای به اندازه حداقل ۱۰۰ فرد غیر خویشاوند ضروری است (۱۱) لذا در این مطالعه تجربی، برای افزایش صحت آنالیز های آماری تعداد ۱۱۳ فرد سالم و غیر خویشاوند انتخاب گردید. پس از کسب رضایت نامه از افراد شرکت کننده و تایید کمیته ی اخلاقی دانشگاه اصفهان، ۱۰ میلی لیتر از خون هر فرد در لوله ی آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر EDTA با غلظت ۰/۵ مولار جمع آوری شد و پس از ثبت مشخصات افراد بر روی لوله ها، جهت انجام مراحل بعدی آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. با استفاده از روش رسوب نمکی میلر، استخراج DNA از نمونه های خون افراد انجام گرفت (۱۲). ارزیابی کمی میزان DNA با استفاده از دستگاه اسپکترو فتومتر انجام شد.

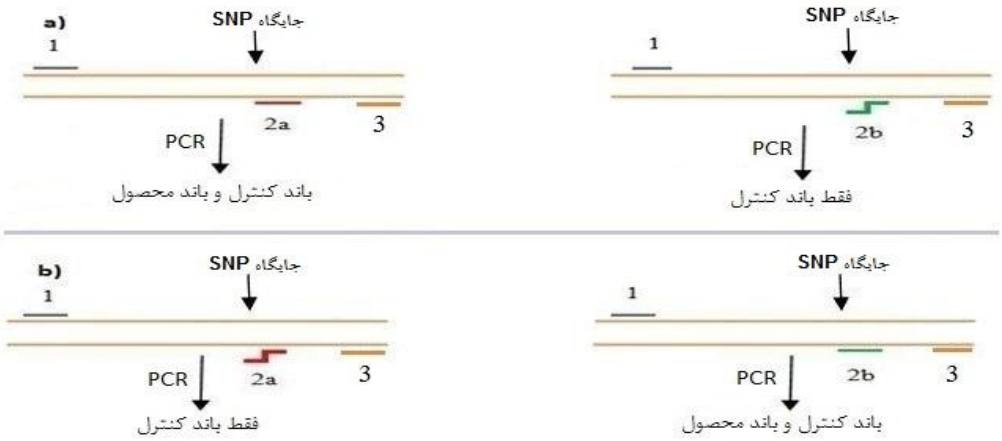
بررسی های بیوانفورماتیک: با استفاده از پایگاه-های داده‌ای نظیر: HapMap، Ensembl، NCBI و SNPper ناحیه ی ژنی *SMPD1* از نظر بیو انفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت (۱۴, ۱۳). پس از بررسی نشانگر های تک نوکلئوتیدی ناحیه ی ژنی *SMPD1* ، در نهایت نشانگر rs67992843 بر اساس معیار هایی نظیر: بالا بودن فراوانی آللی و درجه‌ی هترو زیگوسیتی و قرار گرفتن در بلوک های هاپلو تایپی که در پایگا های داده ذکر شده در بالا به آن اشاره شده بود، انتخاب گردید.

طراحی پرایمر و تعیین ژنوتیپ: تعیین ژنوتیپ نمونه ها با استفاده از تکنیک ARMS PCR

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

(amplification refractory mutation system PCR) انجام شد. این تکنیک امکان آنالیز تنوعات SNP را به روشی سریع، ساده، کم هزینه و با کارایی بالا فراهم می‌کند. در این تکنیک به طور معمول سه پرایمر استفاده می شود. برای نمونه‌ی DNA هر فرد دو واکنش PCR مجزا انجام می گیرد که تفاوت آن ها در وجود پرایمر آلل ۱ در یک ویال و وجود پرایمر آلل ۲ در ویال دیگر است (شکل ۲) (۱۶, ۱۵).



شکل ۲- شمایی ساده از نحوه انجام تکنیک ARMS PCR. در این تکنیک برای هر نمونه DNA دو واکنش PCR انجام می گیرد. در صورتی که فرد هترو زیگوت باشد هر دو واکنش منجر به تولید محصول خواهد شده و در صورتی که فرد همو زیگوت باشد فقط یکی از محصولات آللی قابل رویت خواد بود. پرایمر ۳ به منظور تولید باند کنترل با پرایمر ۱ مورد استفاده قرار می گیرد.

طراحی پرایمر های مورد نظر در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Primer1 انجام شد (۱۸, ۱۷). با اعمال تنظیمات مورد نظر در این نرم‌افزار و مشخص کردن پارامتر هایی مانند دمای بهینه اتصال پرایمر ها، حداقل و حداکثر طول پرایمر ها، درصد GC موجود در پرایمرها و چندین متغیر دیگر، پرایمرهای مناسب توسط این نرم افزار پیشنهاد گردیدند. سپس پرایمر های پیشنهادی در نرم ا فزار Oligo v7 وارد و از نظر ویژگی هایی نظیر: اتصال پرایمر ها به جایگاه غیر اختصاصی، تشکیل داپلکس بین پرایمر ها و تشکیل ساختار سنجاق سری درون پرایمری، مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت نیاز تغییرات لازم در آن ها اعمال شد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی پرایمر های طراحی شده برای تکنیک ARMS PCR. محصول پرایمر های FO-RO به عنوان کنترل بوده و نشان‌دهنده ی انجام واکنش PCR می باشد. پرایمر های RN.G و RN.C جهت تکثیر اختصاصی آلل های این نشانگر طراحی شده اند.

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	طول محصول (جفت باز)
Forward outer (FO) رفت خارجی	5′- CTTCATTGAGGGCAACCACTCCT-3′	427 (FO-RO)
Reverse outer (RO) برگشت خارجی	5′- AGGGAGGGCCAGGAGCAGTA-3′	427 (FO-RO)
Reverse inner G (RN.G) رفت داخلی G	5′- AAAAGCCTGGTGCGGCAATAC-3′	273 (FO-RN.G)
Reverse inner C (RN.C) رفت داخلی C	5′- AAAAAGCCTGGTGCGGCAATAG-3′	273 (FO-RN.C)

تکثیر پرایمر ها به این صورت بود که پرایمر های رفت خارجی (forward outer) و برگشت خارجی (reverse outer) باعث تکثیر باند کنترل، پرایمر های رفت خارجی و برگشت داخلی G (reverse inner G) باعث تکثیر آلل C، و رفت خارجی و برگشت داخلی C (reverse inner C) باعث تکثیر آلل G می‌شدند. پس از بهینه کردن واکنش ARMS PCR از نظر دمای مناسب اتصال پرایمر ها، غلظت مناسب $MgCl_2$ و dNTP و هم چنین غلظت مناسب پرایمر ها، واکنش PCR بهینه‌شده در حجم ۲۵ میکرو لیتر که شامل ۱ میکرو لیتر DNA (۱۰۰ ng/µl)، ۰/۷۵ میکرو لیتر پرایمر FO، ۰/۵ میکرو لیتر پرایمر RO، ۱ میکرو لیتر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

پرایمر RN.C (ویال ۱)، ۱ میکرو لیتر پرایمر RN.G (ویال۲) (غلظت تمام پرایمر ها ۱۰ پیکو مول بر میکرو لیتر)، ۰/۷۵ میکرو لیتر MgCl2 ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرو لیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۰/۲ میکرو لیتر taq (5unit/µl)، ۲/۵ میکرو لیتر 10X PCR buffer و در نهایت ۱۷/۸ میکرو لیتر ddH2O بود، انجام گرفت. جهت انجام PCR از دستگاه ترمو سایکلر (مدل Eppendorf آلمان) طبق شرایط جدول ۲ استفاده شد.

جدول ۲- شرایط دمایی انجام واکنش ARMS PCR در دستگاه ترمو سایکلر (Eppendorf آلمان)

مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تکرار
۱	۹۴	۳	۱
۲	۹۴	۱	
۳	۵۷	۱	۳۵
٤	۷۲	۱	
٥	۷۲	۵	۱

الکتروفورز محصولات PCR نیز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و ولتاژ ۱۰۰ ولت، به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ-آمیزی گردید و با استفاده از دستگاه Gel documentation (Biometra) ژنوتیپ افراد آشکار سازی شد (شکل ۲). با توجه به ژنوتیپ افراد سه الگوی مختلف در ژل قابل مشاهده است که در شکل ۳ این سه الگو نشان داده شده اند.

تحلیل آماری:

در نهایت آنالیز های آماری بر روی نتایج حاصل از تعیین ژنوتیپ افراد مورد آزمایش که شامل تخمین فراوانی آللی و درجه ی هترو زیگوسیتی، فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار،تعادل هاردی-واینبرگ و هم چنین محاسبه ی شاخص آگاهی دهندگی چند شکلی (Polymorphic Information Content) بود، با استفاده از نرم افزار های Powermarker و Genepop انجام شد (۲۱-۱۹).

یافته های پژوهش:

در این مطالعه نشانگر rs67992843 با استفاده از تکنیک ARMS PCR و پرایمر های طراحی شده جدید در نمونه ای از جمعیت ایرانی تعیین ژنوتیپ شد. با توجه به ژنوتیپ افراد، سه الگوی متفاوت مشاهده می شود که در شکل ۳ نمونه ای از آن نشان داده شده است.

پس از تعیین فراوانی آللی و ژنوتیپی داده ها، برقراری تعادل هاردی- واینبرگ (Hardy-Weinberg equilibtium) برای این نشانگر با استفاده از نرم افزار Genepop محاسبه شد (۲۲). مقدار p توسط این نرم - افزار ۰/۳۹۳۴ محاسبه گردید که بزرگ تر بودن این عدد از ۰/۰۵، نشان دهنده ی بر قراری تعادل برای این نشانگر در جمعیت مورد مطالعه است. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده و مورد انتظار نیز با استفاده از این نرم - افزار محاسبه گردید که در جدول ۳ با جزئیات نشان داده شده اند.

جدول ۳- فراوانی ژنوتیپی مشاهد ه‌شده و مورد انتظار برای نشانگر rs67992843.

	ژنوتیپ ها		
	CC	GC	GG
فراوانی مشاهده شده	۱۳ (٪۱۱/۵)	۴۵ (٪۳۹/۸)	۵۵ (٪۵۵/۷)
فراوانی مورد انتظار	۱۱/۰۵ (٪۹/۷۸)	۴۸/۹۱ (٪۴۳/۲۸)	۵۳/۰۴ (٪۴۶/۹۴)

بر اساس اطلاعات این جدول ، درصد فراوانی همو زیگوسیتی و هترو زیگوسیتی مشاهده شده به ترتیب ۶۰/۱۸ ٪ و ۳۹/۸۲ ٪ به دست آمد. هم چنین درصد فراوانی آللی مشاهده شده برای آلل‌های G و C نیز به ترتیب ۶۸/۵۸ ٪ و ۳۱/۴۲ ٪ محاسبه شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

پس از تعیین فراوانی آللی و درجه ی هتـرو زیگوسـیتی نشانگر مزبور، اطلاعات به دست آمده در این مطالعه با نتایج گزارش شده از این نشانگر در تعدادی از جمعیـت های دیگر جهان با اسـتفاده از پایگـاه داده Ensembl مورد مقایسه قرار گرفت که در جدول ۴ آورده شده انـد (۲۳). در این جدول درصد فراوانی آلل C و هـم چنـین فراوانـی هتـرو زیگوسـیتی ایـن نشـانگر در تعـدادی از جمعیت ها آورده شده‌اند.

جدول ٤- مقایسه ی درصد فراوانی آلل C و هترو زیگوسیتی مارکر rs67992843 در تعدادی از جمعیت های جهان

جمعیت	درصد فراوانی آلل C	فراوانی هترو زیگوسیتی
امریکا	۹/۷	۱۵/۹
قبیله لویا کنیا	۳۳/۳	۳۸/۴
کلمبیا	۱۳/۸	۲۳/۴
ایران(مطالعه حاضر)	۳۱/۴۲	۳۹/۸
فنلاند	۹/۶	۱۷/۲
بریتانیا	۱۱/۵	۲۰/۹
بنگلادش	۱۲/۸	۲۵/۳
هندی های ساکن انگلیس	۲۱/۶	۳۵/۳

با توجه به اطلاعات ارائه شده در این جـدول، جمعیـت مطالعه شده در کنیا دارای بیش ترین فراوانی آلـل C و جمعیت فنلاند دارای کم ترین فراونی برای این آلل در بین جمعیت های مطالعه شده می‌باشند.

معیاری که بر اسـاس آن گویـا بـودن یـا نبـودن یـک نشانگر جهـت مطالعـات آنـالیز پیوسـتگی و تشـخیص مولکولی بیماری ها استفاده می‌گردد، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) نـام دارد. مقـدار PIC بـزرگ تـر از ۰/۲۵ نشان دهنده ی آگاهی دهنده بودن نشانگر بـوده و بدین معنی است که مـی تـوان از آن نشـانگر جهـت انجام آنالیز های پیوستگی در آن جمعیت استفاده نمـود (۲۴). جهت تخمین مقدار PIC در جمعیت مورد مطالعه از نرم افزار Powermarker استفاده شـد. همـان طـور که اشاره شد، PIC جهت تعیین آگاهی دهنـدگی یـک نشانگر در مطالعات آنالیز پیوستگی مورد اسـتفاده قـرار می گیرد. این فاکتور برای نشانگر هایی که در جمعیـت مورد مطالعه در تعادل هـاردی- واینبـرگ قـرار دارنـد، تعریـف مـی شـود. ایـن فـاکتور بـه درجـه ی هتـرو زیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت و هم چنین فراوانی آلل ها وابسته است (۲۴). پس از وارد نمودن اطلاعـات ژنوتیپ افراد به نرم افزار فوق الذکر بـر اسـاس فرمـت خواسته شده و انجام آنالیز هـای مـورد نیـاز در نهایـت مقدار PIC= ۰/۳۳۸ محاسبه گردید. این مقـدار PIC، نشـان دهنـده ی اطـلاع دهنـدگی بـالای نشـانگر rs67992843 به عنوان یک نشانگر تک نوکلئوتیـدی در جمعیت اصفهان می باشد.

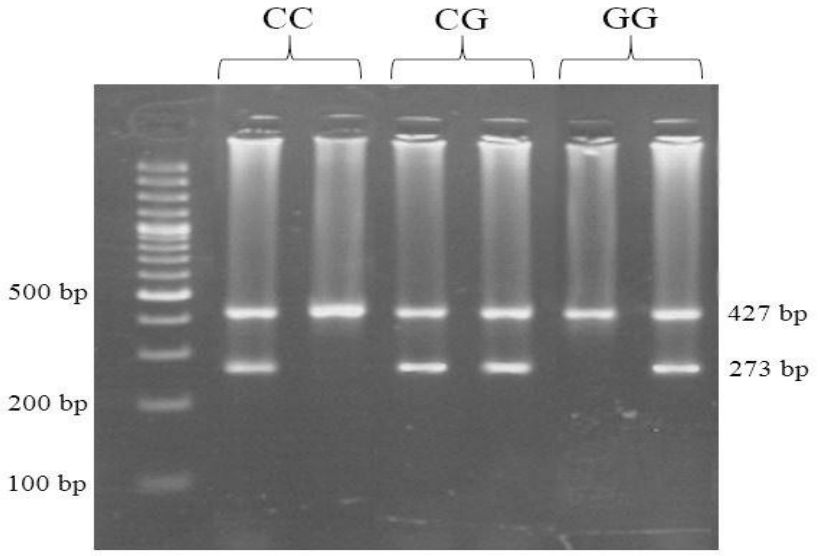
بحث و نتیجه گیری:

چالش مهمی که در تشخیص مولکـولی بیمـاری هـای ژنتیکی وجود دارد در درجه ی اول شناسایی ژن عامـل بیماری (در مورد بیماری هـای هتـروژن) و در درجـه‌ی دوم شناسایی جهش مسئول بیماری می باشد (۲۴). بـا توجه به تعداد زیاد جهش های مرتبط بـا ژن *SMPD1* و بیماری نیمن پیک، شناسایی جهشی کـه باعـث ایـن بیماری می شود با روش مسـتقیم بسـیار پـر هزینـه و زمان بر خواهد بود. با توجه به دلایل ذکر شده اسـتفاده از روش غیر مستقیم و اسـتفاده از نشـانگر هـای چنـد شکلی به عنوان راه حل جایگزین پیشنهاد می گردد. تا به امروز در رابطه با بیماری نیمن پیـک و نیـز جهـش هـای بیمـاری زای ژن *SMPD1* در ایـران مطالعـات محدودی انجام گرفته است. از جمله ی ایـن مطالعـات می توان به مطالعـه ی معتمـدی و همکـاران در سـال ۲۰۰۵ اشاره کرد که یک مورد NPD تیـپ B گـزارش کرده و دوره بالینی بیمار را توصیف نمودند (۲۵). معتمد و همکاران در سال ۲۰۱۱ یک مطالعه ۱۰ ساله بر روی بیوپسی کبد در مرکز پزشـکی کودکـان تهـران انجـام دادند. آن ها تعداد زیادی بیمـار بـا نـا هنجـاری هـای ذخیره ای شناسایی کردند که بیش تر این بیمـاران بـه

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

NPD مبتلا بودند (۲۶). گله داری و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، حذف یک گوانین در اگزون ۲ ژن *SMPD1* را گزارش کردند که سبب NPD تیپ A می شود (۲). هم چنین از جمله مطالعاتی که در دنیا جهت شناسایی تنوعات SNP بیماری زای ژن *SMPD1* صورت گرفته می‌توان به مطالعه ی رین اشاره کرد. رین و همکارانش در سال ۲۰۱۵، چهار SNP را بررسی کردند و متوجه شدند که از بین این چهار SNP، فقط یکی از آن ها (c.973C>G)، سبب فقدان عملکرد آنزیم ASM می گردد و سه SNP دیگر فعالیت ASM را حدود ۵ برابر افزایش می‌دهند (۲۷). آکونا و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵، فراوانی و خصوصیات ژنتیکی جهش p.Ala359Asp را با یک سری نشانگر ژنتیکی از جمله rs72896270، rs11040859، rs7128818، rs1542705، rs72896270، rs74053351، rs11601088، rs1050239 در جمعیت مردم شیلی بررسی کردند و متوجه شدند که این جهش فعالیت آنزیم ASM را حدود ۹۵٪ کاهش می دهد و سبب NPD تیپ B می گردد (۲). در این پژوهش پس از مطالعه نشانگر های تک نوکلئوتیدی ناحیه ی ژنی *SMPD1* ، در نهایت نشانگر rs67992834 که در ناحیه ی اینترونی این ژن قرار گرفته و دارای دو آلل G/C می باشد به منظور مطالعه در جمعیت ایران انتخاب شد(شکل ۳).



شکل ۳- نمونه ای از نتیجه ی تعیین ژنوتیپ سه فرد بر روی ژل الکتروفورز ۲ درصد بر اساس روش ARMS PCR.

پس از مطالعه ی این نشانگر در جمعیت اصفهان، فراوانی آلل‌های G و C به ترتیب ۶۸/۵۸ ٪ و ۳۱/۴۲ ٪ محاسبه شد. نتایج حاصل از این مطالعه از یک سو می‌تواند با مشخص نمودن این نشانگر به عنوان یک نشانگر آگاهی دهنده، جهت تشخیص مولکولی بیماری نیمن پیک در جمعیت ایران کمک نماید و از سوی دیگر در ایجاد بانک اطلاعاتی نشانگر های ژنی جمعیت ایرانی مورد استفاده قرار گیرد. معیاری که بر اساس آن گویا بودن یا نبودن یک نشانگر جهت مطالعات آنالیز پیوستگی و تشخیص مولکولی بیماری ها استفاده می گردد، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نام دارد. مقدار PIC بزرگ تر از ۰/۲۵ نشان - دهنده ی آگاهی دهنده بودن نشانگر بوده و بدین معنی است که می‌توان از آن نشانگر جهت انجام آنالیز های پیوستگی در آن جمعیت استفاده نمود. جهت تخمین مقدار PIC در جمعیت مورد مطالعه از نرم افزار Powermarker استفاده شد. همان طوری که اشاره شد، PIC جهت تعیین آگاهی دهندگی یک نشانگر در مطالعات آنالیز پیوستگی مورد استفاده قرار می گیرد. این فاکتور برای نشانگر هایی که در جمعیت مورد مطالعه در تعادل هاردی- واینبرگ قرار دارند، تعریف می‌شود. این فاکتور به درجه‌ی هترو زیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت و همچنین فراوانی آلل‌ها وابسته است(۲۳) و از آن جا که میزان PIC این نشانگر بیشتر

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

از ۰/۲۵ است بنا بر این به عنوان یک نشانگر آگاهی دهنده در جمعیت اصفهان معرفی می شود. هم چنین، نتایج به دست آمده در این مطالعه با نتایج گزارش شده در دیگر جمعیت‌های جهان مورد مقایسه قرار گرفت. نکته ی قابل توجه در این مقایسه این بود که در تعدادی از جمعیت های جنوب شرق آسیا از جمله ژاپن و ویتنام فراوانی این آلل صفر درصد گزارش شده است و فقط آلل غالب وجود دارد. بعد از جمعیت شرق آسیا کمترین فراوانی آلل مغلوب مربوط به جمعیت فنلاند (۹/۶٪) و بعد از آن آمریکا (۹/۷٪) و سپس بریتانیا (۱۱/۵٪) است. بیش ترین فراوانی آلل مغلوب در جمعیت قبیله لویا کنیا (۳۳/۳٪) مشاهده گردیده است. در مطالعه حاضر آلل مغلوب جایگاه دوم را از جهت فراوانی در بین جمعیت های بررسی شده جهان دارد و بعد از جمعیت کنیا دارای بیش ترین فراوانی می باشد (۱۸). از جمله مزیت های بررسی نشانگر های چند شکلی به روش غیر مستقیم این است که، با توجه به تعداد بالای جهش های مرتبط با ژن *SMPD1*، پر هزینه و وقت گیر بودن بررسی مستقیم جهش ها و هم چنین نا مشخص بودن طیف جهش های شایع این ژن در جمعیت ایرانی، بررسی نشانگر های چند شکلی به روش غیر مستقیم و با استفاده از آنالیز پیوستگی توسط پلی مورفیسم های متصل به ژن می تواند روش مناسبی جهت بررسی مولکولی بیماری در جمعیت ارائه نماید. علاوه بر این، با کامل شدن نقشه‌ی ژنتیکی و بلوک های هاپلو تایپی رایج در جمعیت ایران، می توان از آن ها برای شناسایی جهش های رایج و اختصاصی مرتبط با بروز بیماری ها یا مستعد کننده ابتلا به بیماری در این جمعیت، استفاده نمود. با این وجود روش غیر مستقیم نیز دارای محدودیت هایی می باشد که از جمله‌ی این محدودیت ها می‌توان به غیر قابل استفاده بودن آن در خانواده هایی اشاره کرد که در آن ها بیماری فرد به دلیل جهش جدید است و یا هیچ سابقه ی خانوادگی برای بیماری در خانواده وجود نداشته باشد (۲۳). با توجه به تجربیات به دست آمده از مطالعه حاضر، موارد زیر برای تحقیقات آینده پیشنهاد می شود: ۱) بررسی هاپلو تایپ های به دست آمده از مطالعه حاضر در دو گروه افراد سالم و افراد بیمار و مقایسه نتایج حاصل با یکدیگر ۲) تخمین فراوانی آللی، درجه هترو زیگوسیتی و عدم تعادل پیوستگی بین مارکر های بررسی شده در مطالعه حاضر در نواحی مختلف ایران به تفکیک موقعیت جغرافیایی و قومی- نژادی ۳) تخمین فراوانی آللی و درجه هترو زیگوسیتی سایر چند شکلی های تک نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *SMPD1* در جمعیت ایران ۴) بررسی عدم تعادل پیوستگی بین سایر چند شکلی های تک نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *SMPD1* با استفاده از تعداد نمونه بیشتر در جمعیت ایران ۵) تعیین هاپلو تایپ های گویای سایر چند شکلی های تک نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *SMPD1* در جمعیت ایران. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، می‌توان نشانگر rs67992843 که در ناحیه‌ی اینترونی ژن *SMPD1* قرار گرفته است را به عنوان نشانگری گویا در تشخیص های مولکولی بیماری نیمن پیک به روش غیر مستقیم و از طریق مطالعات پیوستگی در جمعیت اصفهان معرفی نمود. هم چنین می توان از اطلاعات حاصل از این مطالعه در کامل نمودن نقشه ی ژنتیکی جمعیت ایران و شناخت بهتر ویژگی های جمعیتی آن و هم چنین شباهت ها و تفاوت های آن با سایر جمعیت های جهان استفاده نمود.

References

1. Schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann pick disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab2015;29:237-47.
2. Acuña M, Martinez P, Moraga C, He X, Moraga M, Hunter B, et al. Epidemiological, clinical and biochemical characterization of the p. Ala359Asp SMPD1 variant causing Niemann pick disease type B. European J Hum Genet 2016;24:208-13.
3. Wasserstein MP, Desnick RJ, Schuchman EH. Types A and B Niemann pick disease lysosomal storag 4. schuchman EH, Wasserstein MP. Types A and B Niemann pick disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab2015;29:237-47.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

4. Rezaei H, Vallian S. BanI/D13S141/D13S175 represents a novel informative haplotype at the GJB2 gene region in the Iranian population. Cell Mole Neurobiol2011;31:749-54.
5. Nadeali Z, Karimi A, Vallianborujeni S. Analysis of genetic variation of rs4148326 marker located in UGT1A1 gene region an informative marker for molecular diagnosis of crigler-najjar syndrome. J Isfahan Med Sch 2014;31:260.
6. Selmer KK, Brandal K, Olstad OK, Birkenes B, Undlien DE, Egeland T. Genome-wide linkage analysis with clustered SNP markers. J Biomole Screen 2009;14:92-6.
7. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic acids research. 1988;16:1215.
8. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. DbSNP the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res2001;29:308-11.
9. Cheung KH, Osier MV, Kidd JR, Pakstis AJ, Miller PL, Kidd KK. Alfred an allele frequency database for diverse populations and DNA polymorphisms. Nucleic Acids Res2000;28:361-3.
10. Little S. Amplification refractory mutation system analysis of point mutations. Current Prot Hum Genet2001:9.8. 1-9.8. 12.
11. Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I, Sabatti M. Allele specific PCR in SNP genotyping. Sin Nucle Pol Meth Prot2009;2:415-24.
12. Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. Nucleic Acids Res2001;29:88.
13. Collins A, Ke X. Primer design web service for tetra primer ARMS-PCR. Open Bioinform J 2012;6:55-8.
14. Rousset F. Genepop 007 a complete re implementation of the genepop software for Windows and Linux. Mole Ecolo Res 2008;8:103-6.
15. Lui K, Muse S. Powermarker integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics2005;21:2128-9.
16. Raymond M, Rousset F. Genepop version 1.2 population genetics software for exact tests and ecumenicism. J Heredit1995;86:248-9.
17. Engels WR. Exact tests for hardy weinberg proportions. Genetics 2009;183:1431-41.
18. Cunningham F, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, et al. Nucle Acids Res2015;43: 662-9.
19. 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 J Pediatr2013;23:233.
20. Vanier M. Niemann-pick diseases. Clin Neurol2012;113:1717-21.
21. Aykut A, Karaca E, Onay H, Ucar SK, Coker M, Cogulu O, et al. Analysis of the sphingomyelin phosphodiesterase 1 gene in Turkish Niemann pick disease patients mutation profile and description of a novel mutation. Genetics2013;526:484-6.
22. Elder DE, Ferrell LD, Kakar S. Liver pathology. 3th ed. Demos Medical Publication.2011;P.133-6.
23. Karimi A, Vallian S. [Analysis of genetic variation of rs11658369 marker in AIPL1 gene as an informative marker for molecular diagnosis of leber congenital Amaurosis in Isfahan population]. Genet Third Mille2014; 11:3260-9. (Persian)
24. Kalantarmotamedi M, Khoddami M, Naseri M. Type B Niemann pick disease report of a case with miliary pattern on chest x-ray. Arch Iranian Med2005;8:223-5.
25. 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. Hepat Month2011;2011:652-5.
26. Rhein C, Muhle C, Kornhuber J, Reichel M. Alleged detrimental mutations in the SMPD1 gene in patients with Niemann-pick disease. Int J Mole Sci2015;16:13649-52.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]

Analysis of Allele Frequency and Genotyping of rs67992843 Marker in SMPD1 Gene Region Associated with Niemann Pick Disease in Isfahan Population

*Ebrahimi N[1], Vallianborujeni S[2]**

Accepted: August 13, 2016) **(Received: May 4, 2016**

Abstract

***Introduction*:** Niemann Pick Disease (NPD) is a lipid storage disorder with an autosomal recessive inheritance. The disease occurs mainly due to defects in *SMPD1* gene (11p15.4), encoding sphingomyelinase. Disruption of this enzyme leads to the accumulation of sphingomyelin in brain and liver resulting in dysfunction or damage of the brain tissues.

Polymorphic markers such as Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) are used in molecular diagnosis of genetic disease through linkage analysis or homozygosity mapping. The allele frequency and degree of heterozygosity of the markers are usually population dependent. The aim of this study was to investigate the allele frequency and degree hetereozygosity of rs67992843 marker located in the *SMPD1* gene region in the Iranian population.

***Materials & methods*:** 113 unrelated individuals were selected for this study. The marker was genotyped using ARMS PCR with newly designed primers. The results were analyzed by Genepop database and Power Marker software to estimate allelic frequency, heterozygosity rate, presence of Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) and polymorphism information content (PIC).

***Findings*:** The data showed 31.42% Minor Allele Frequency (MAF), 39.82% heterozygosity rate and PIC 0.338 for rs67992843 marker in the Iranian population.

***Discussion & conclusions*:** The results of this study showed that rs67992843 marker could be suggested for linkage analysis and molecular diagnosis of *SMPD1* gene in the Iranian population.

***Keywords*:** Single nucleotide polymorphism, Niemann pick disease, *SMPD1*, ASM, Iranian population

1. Dept. of Biology, Faculty of Science, Isfahan University, Isfahan, Iran
**Corresponding author Email:* svallian@biol.ui.ac.ir

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-09-05]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.4.151]