

بررسی تعداد حذف اگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی
عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژیک بیمارستان قائم (عج) و
جهاد دانشگاهی مشهد جهت کمک به درمان این بیماران

فرزانه خلیلیان

اساتید راهنما:

دکتر محمدتقی فرزادفرد (دانشیار گروه مغز و اعصاب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد)

دکتر آریانه صدرنبوی (دانشیار گروه ژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد)

اساتید مشاور:

دکتر محمد شریعتی (استادیار گروه مغز و اعصاب جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد)

داوران:

دکتر فریبرز رضایی طلب (استادیار گروه مغز و اعصاب دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد)

دکتر حسن مهرداد مجد (استادیار گروه سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد)

این پایان نامه براساس طرح پژوهشی شماره ۴۰۱۰۲۸۸ مصوب تاریخ ۱۴۰۱/۰۹/۲۳ و مجوز کمیته اخلاق شماره IR.MUMS.MEDICAL.REC.1401.520 مصوب تاریخ ۱۴۰۱/۰۹/۰۱ با عنوان " بررسی تعداد حذف اگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم (عج) و جهاد دانشگاهی مشهد جهت کمک به درمان این بیماران " انجام شده است.

عقاید و نظراتی که در این پایان نامه ذکر گردیده است، مستقیماً به نویسندگان آن مربوط است و از طرف دانشگاه علوم پزشکی مشهد تایید و یا تکذیب نمی شود. مالکیت حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی مشهد است و هرگونه توافقی با شخص ثالث بدون اجازه کتبی دانشگاه مجاز نمی باشد. تکثیر کل یا جزئی از این اثر تنها با اجازه کتبی نویسندگان مجاز است. استفاده از محتوا و پیام پایان نامه در مقاله ها یا هر مکتوبه دیگری با ذکر منبع بلامانع است.



دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دانشکده پزشکی

بررسی تعداد حذف اگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی
مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژیک بیمارستان قائم (عج) و جهاد دانشگاهی مشهد جهت
کمک به درمان این بیماران

برای دریافت درجه دکترای حرفه ای در رشته پزشکی در تاریخ ۱۴۰۲/۱۱/۲۵ ساعت ۸:۳۰ توسط

فرزانه خلیلیان

با موفقیت دفاع شد.

شماره پایان نامه: P10195

سال تحصیلی 1402-1403





فهرست

۲	چکیده
۳	مقدمه
۳	اهمیت موضوع در جامعه
۵	مشکل نیازمند بهبود و ضرورت انجام پژوهش
	تغییر/اهل‌های فرضی برای بهبود و رفع مشکل/نیاز با ذکر شواهد
۵	اهداف پایان نامه
۶	روش اجرا و مواد مورد استفاده
۶	محل و تاریخ اجرا
۶	مواد و وسایل مورد استفاده/آزمودنی ها
۶	طراحی مطالعه
۶	مداخله در صورت وجود
۶	شاخصها/متغیرها شامل مواجهه، پیامد، مخدوش کننده ها و نحوه اندازه گیری آنها
۷	روش و مراحل اجرا
۸	روشهای آماری و حجم نمونه
۸	ملاحظات اخلاقی
۸	کد و تاریخ مجوز کمیته اخلاق
۸	کد و تاریخ ثبت در I RCT
۹	یافته ها
۱۰	بحث
۱۴	یافته اصلی
۱۴	مقایسه با مطالعات مشابه
۱۵	سایر نکات قابل بحث
۱۶	کاربرد/کاربست
۱۷	محدودیتها و نقاط ضعف و قوت
۱۷	پیشنهادهای
۱۷	نتیجه گیری
۱۸	پیام پژوهش به جامعه
۱۸	دستآورد و نحوه بکارگیری نتیجه پژوهش
۱۹	حمایت کنندگان
۱۹	تضاد منافع
۲۰	منابع
۲۲	تشکرها
۲۳	تعهدنامه
۲۴	ENGLISH ABSTRACT



چکیده

هدف: آتروفی عضلانی نخاعی، گروهی از بیماری‌های اوتوزومی مغلوب و مرتبط با نوروپاتی حرکتی است. در اکثر بیماران SMN1 محتمل حذف شدگی در اگزون‌های ۷ یا ۸ گردیده است. لذا بررسی جهش‌های این ژن به جهت شناسایی مبتلایان و انجام موثرترین درمان دارویی حایز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی جهش‌های هر دو اگزون ژن مذکور در بیماران مبتلا به SMA بود.

روش اجرا و مواد مورد استفاده: در این مطالعه توصیفی مقطعی، بیماران مبتلا به SMA که در بین سال‌های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۱ به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم (عج) شهر مشهد مراجعه کرده بودند وارد مطالعه شدند. پس از طبقه‌بندی بیماران بر اساس معیارهای کنسرسیون SMA و استخراج DNA از نمونه خون بیماران، بررسی‌های مولکولی از جهت جهش‌های ژن SMN1 به روش PCR-RFLP جهت تشخیص اولیه و به جهت تعداد کپی‌های SMN2 و روش Real time انجام گرفت. از نرم افزار SPSS ورژن ۲۶ جهت آمار توصیفی و آنالیز آماری استفاده شد. P-value کمتر از ۰,۰۵ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تعداد پرونده مربوط به ۳۳۳ بیمار مبتلا به SMA شناسایی و وارد مطالعه شدند. از بین بیماران، ۴۰,۸ درصد مذکر بودند. تعداد ۲۳۴ نفر بالای ۱۸ سال بودند. تعداد ۲۵ نفر (۷,۵ درصد) مبتلا به SMA نوع ۱، تعداد ۹ نفر (۲,۷ درصد) مبتلا به SMA نوع ۲، تعداد ۱۶۷ نفر (۵۰,۲ درصد) مبتلا به SMA نوع ۳ و ۹۷ نفر (۲۹,۱ درصد) مبتلا به SMA نوع ۴ بودند. در تشخیص پیش از تولد، در مجموع ۳۵ مورد (۱۰,۵ درصد) مبتلا به SMA نوع ۰ یافت شد. حذف اگزون ۷ در ۱۷۵ نفر از بیماران تشخیص داده شد. تفاوت معنی داری بین گروه‌های مختلف بیماری ($P > 0,001$) و گروه‌های سنی ($P = 0,003$) از لحاظ حذف اگزون ۷ یافت شد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر میتواند تصویر کلی از بررسی DNA بیماران SMA و میزان جهش در ژن SMN1 در بین مبتلایان به بیماری SMA در شهر مشهد را نشان دهد. این موضوع دربرگیرنده درست داروهای چون اسپین رازا و داروهای که در آینده وارد بازار دارویی خواهند شد بسیار موثر و کاربردی خواهد بود.

کلید واژه‌ها: آتروفی عضلانی نخاعی، SMN1، اگزون ۷



بیماری آتروفی عضلانی نخاعی^۱، یکی از بیماری‌های عصبی-عضلانی کشنده در کودکان می‌باشد که بعد از دیستروفی عضلانی دوشن، به عنوان شایع‌ترین بیماری اتوزوم مغلوب شناخته می‌شود که منجر به انحطاط نورون‌های حرکتی تحتانی می‌شود (۱). این بیماری با تخریب سلول‌های شاخ قدامی در نخاع و در هسته‌های اعصاب مجامه‌ای تحتانی مشخص می‌شود که منجر به ضعف متقارن و پیشرونده عضلانی می‌شود (۲) (۳). میزان شیوع این بیماری ۱ در ۶۰۰۰-۱۰۰۰۰ در هر تولد زنده گزارش شده است و احتمال ناقل بودن افراد، ۱ در ۴۰ می‌باشد (۴). طی این بیماری، حذف یا جهش در ژن SMN1^۲ رخ می‌دهد و در نتیجه ی آن، نورون‌های حرکتی شاخ قدامی نخاع و هسته‌های حرکتی ساقه مغز تحلیل می‌روند (5, 6). به طور کلی علایم بالینی بیماری شامل ضعف عضلانی عمدتاً پروگزیمال با درگیری بیشتر اندام تحتانی و آرفلکسی منتشر است. ضعف عضلات بولبار و تنفسی به ویژه در موارد شدیدتر می‌تواند رخ دهد. عضلات صورت و چشم عموماً درگیر نمی‌شوند (۷). بر اساس کنسرسیوم بین‌المللی SMA، بیماری SMA بر اساس سن بروز علائم و شدت بیماری، به سه نوع I، II و III طبقه‌بندی می‌شود که از طریق آزمایشات بالینی، نمونه برداری عضلانی و الکتروفیزیولوژی مشخص می‌شود (۱).

شدیدترین فرم این بیماری، SMA نوع ۱ یا Werdnig Hoffmann می‌باشد که سن بروز آن از تولد تا شش ماهگی می‌باشد. در این فرم بیماری کودکان هیچگاه قادر به نشستن بدون کمک نیستند و معمولاً نوزادان به دلیل مشکلات تنفسی تا قبل از دو سالگی فوت می‌کنند. SMA نوع ۲ فرم متوسط بیماری بوده که بروز آن از شش ماهگی تا بیست و چهار ماهگی می‌باشد و با توجه به میزان اختلال در سیستم تنفسی، این بیماران تا ده سال عمر می‌کنند و کودک قادر به نشستن یا راه رفتن بدون کمک نمی‌باشد. خفیف‌ترین نوع این بیماری، SMA نوع ۳ یا Kugelberg-Welander می‌باشد. در این فرم بیماری کودک همه شاخص‌های حرکتی را کسب میکند که علائم بالینی آن بعد از هجده ماهگی نمایان می‌شوند. نوعی از بیماری که در سنین برگسالی بروز می‌کند اصطلاحاً نوع ۴ نامیده می‌شود که سن بروز آن مختلف و از دهه دوم تا پنجم گزارش شده است (۶-۸).

¹ spinal muscular atrophy

² Survival Motor Neuron 1

جدول 1: تقسیم بندی بیماری SMA بر اساس معیارهای کنسرسیوم بین المللی SAM

انواع SMA	سن بروز	علائم	مرگ
نوع ۰	قبل از تولد	کاهش حرکات در زمان جنینی/ عدم وجود تون عضلانی در زمان تولد	زیر ۶ ماهگی
نوع ۱	از تولد تا شش ماهگی	بدون کمک قادر به نشستن نیستند	زیر ۲ سالگی
نوع ۲	از شش ماهگی تا ۱۸ ماهگی	می نشینند اما قادر به راه رفتن نیستند	بعد ۲ سالگی
نوع ۳	از ۱۸ ماهگی	تا سن خاصی قادر به راه رفتن هستند	بزرگسالی
نوع ۴	بزرگسالی	ضعف عضلانی خفیف تا متوسط	بزرگسالی

در سال ۱۹۹۵ ژن مربوط به بیماری SMA توسط لفبور و همکارانش شناسایی شد. این ژن SMN نام دارد و در اکثر بیماران دچار جهش شده است (۹). پروتئین SMN توسط ژن SMN1 که بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره پنج قرار دارد، کدگذاری می شود و حذف آن منجر به بروز بیماری SMA می شود. تقریباً ۹۵ درصد از جهش ها در این ژن مربوط به حذف هموزیگوت آگزون هفت می باشد؛ جهش های درون ژنی در SMN1، علت ایجاد ۵ درصد باقی مانده از بیماران SMA می باشد و شواهد بیشتری برای حمایت از SMN1 به عنوان ژن مسئول SMA ارائه می دهد (۱۰، ۱۱). علاوه بر این، سودوژن SMN1 تحت عنوان SMN2، بر روی کروموزوم پنج قرار دارد. جهش در ژن SMN1 شاخص پیشرفت بیماری است در حالی که نسخه های SMN2، نسخه همولوگ SMN1 به عنوان فاکتور تغییر دهنده فنوتیپ اهمیت دارد. در آزمایشات ژنتیکی، از دو روش RFLP^۳ و real-time PCR^۴ جهت بررسی حذف در آگزون هفت ژن SMN1 استفاده می شود (۵، ۱۰).

با توجه به شیوع بالای ازدواج فامیلی در کشور ما و به تبع آن افزایش نرخ بیماری های ژنتیکی با توارث اتوزوم مغلوب، بیماری SMA به عنوان یکی از علل شایع مرگ و میر در میان نوزادان و کودکان در ایران به شمار می رود. اکثر این بیماران با حذف هموزیگوت آگزون هفت و یا هشت ژن SMN1 مشخص می شوند. به همین جهت، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی فراوانی حذف آگزون هفت در ژن SMN1 در بین بیماران مبتلا به بیماری

³ Restriction fragment length polymorphism⁴ Polymerase chain reaction



SMA مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم، به منظور ارائه خدمات درمانی بهتر و مناسب تر و همچنین افزایش پیش آگهی در بین بیماران مبتلا به این بیماری می باشد.

اهمیت موضوع در جامعه

با توجه به شیوع بالای ازدواج های فامیلی در ایران، نتایج پژوهش حاضر و تعیین فراوانی جهش های این بیماری می تواند به تصمیمات سیاست گذاران در حوزه سلامت و مدیریت منابع در درمان این بیماری و همچنین تشخیص پیش از تولد سودمند باشد. بدین ترتیب، تصمیم گیری درستی در ارائه خدمات کارآمد در زمینه مشاوره ژنتیک، غربالگری، پیش آگهی، و اقدامات حمایتی برای خانواده ها صورت خواهد گرفت.

مشکل نیازمند بهبود و ضرورت انجام پژوهش

با توجه به اینکه درمان این بیماری مراحل اولیه خود را طی می کند و درمان قابل اعتمادی برای آن مشخص نشده است، با اجرای این طرح، میزان شیوع بیماری آتروفی عضلانی نخاعی بر اثر حذف آگزون هفت در ژن SMN1 در شهر مشهد مشخص خواهد شد و با توجه به نتایج حاصل از این طرح، پژوهشگران می توانند به دنبال یافتن طرح درمان مناسب با شرایط بیماران باشند و افزایش پیش آگهی در بیمارانی شوند که برای درمان به آن ها مراجعه می کنند و به این ترتیب بار مالی و روانی وارد شده به خانواده ها و همچنین نظام سلامت کشور کاهش خواهد یافت.

اهداف پایان نامه

- تعیین فراوانی حذف آگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی
- تعیین فراوانی حذف آگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم بر حسب جنس
- تعیین فراوانی حذف آگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم بر حسب سن
- تعیین فراوانی حذف آگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم بر حسب شدت بیماری



روش اجرا و مواد مورد استفاده

محل و تاریخ اجرا

این مطالعه از نوع توصیفی مقطعی (Cross Sectional) می باشد که بین سال های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۱ در درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم شهر مشهد انجام شد.

مواد و وسایل مورد استفاده/آزمودنی ها

در این پژوهش از پرونده های موجود از بیماران در درمانگاه نوروزنتیک بیمارستان قائم برای استخراج اطلاعات لازم استفاده خواهد شد. آزمودنی های مطالعه شامل بیماران با تشخیص قطعی SMA که تست تشخیصی جهت تعیین حذف اگزون ۷ برای آنها انجام شد.

طراحی مطالعه

مقطعی

مداخله در صورت وجود

ندارد

شاخصها/متغیرها شامل مواجهه، پیامد، مخدوش کننده ها و نحوه اندازه گیری آنها

متغیر های ارزیابی شده در این مطالعه و نقش آن ها به تفکیک در جدول ۲ آورده شده است.



جدول ۲: متغیرها و نحوه ی اندازه گیری آن ها

نام متغیر	نوع (کمی پیوسته، کمی گسسته، کیفی)	نقش (مستقل، وابسته، زمینه ای، مخدوش کننده)	تعریف کاربردی	واحد اندازه گیری
جنسیت	کیفی اسمی	زمینه ای	بر اساس فنوتیپ فرد	مذکر، مونث
سن	کمی پیوسته	زمینه ای	تعداد سال های گذشته از تولد فرد	سال
تعداد حذف آگزون هفت در ژن SMN1	کیفی اسمی	زمینه ای	بر اساس نتیجه تست PCR- RFLP	حذف آگزون ۷ حذف آگزون ۸ حذف هر دو آگزون ۷ و ۸ عدم حذف در آگزون ۷ و ۸
شدت بیماری	کیفی رتبه ای	زمینه ای	بر اساس کنسرسیوم بین المللی SMA	نوع ۰ نوع ۱ نوع ۲ نوع ۳ نوع ۴

روش و مراحل اجرا

در این مطالعه اطلاعات ثبت شده در پرونده بیماران در بین سال های ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۱، استخراج شد. به همین منظور پرونده کلیه بیماران مبتلا به SMA که از ابتدای فروردین سال ۱۳۹۶ تا ابتدای فروردین سال ۱۴۰۱ به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم شهر مشهد مراجعه کرده بودند بررسی شد. بیمارانی که دارای پرونده ناقص بوده و یا رضایت به همکاری در این طرح را نداشته اند، از مطالعه خارج شدند.

بیماران مورد مطالعه، بر اساس معیار های کنسرسیوم بین المللی SMA انتخاب شدند و تشخیص بالینی با بررسی علائم بیماری و یا الکترومیوگرافی (EMG) تایید شدند. جهت شناسایی حذف آگزون هفت در SMN1، ژنومی از خون محیطی بیماران با روش Salting Out تهیه شد و با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. محصولات PCR با رنگ آمیزی نقره نیترات قابل مشاهده هستند. افراد طبیعی و ناقل SMA دارای قطعاتی به طول ۱۸۸، ۱۴۹ و ۳۹ جفت باز هستند در حالی که در بیماران مبتلا به SMA تنها یک قطعه ۱۴۹ جفت بازی قابل مشاهده است. نتایج آزمایشات فوق به همراه اطلاعاتی مانند سن، جنس، نوع بیماری، و حذف آگزون هفت در ژن SMN1 در این بیماران، از بین پرونده ها استخراج شده و نتایج در قالب پایان نامه گزارش گردید.



روشهای آماری و حجم نمونه

داده های جمع آوری شده در نرم افزار اکسل ذخیره شدند در نهایت در نرم افزار SPSS ورژن ۲۶ وارد شدند. متغیرهای کیفی به صورت تعداد (فراوانی) به همراه درصد توصیف گردید. جهت مقایسه فراوانی متغیرها در بین گروه های مختلف، از تست مربع کای X^2 و تست دقیق فیشر استفاده شد. P-value کمتر از ۰,۰۵ به صورت معنادار تعریف شد.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش از پرونده های موجود از بیماران در درمانگاه نورولوژیک بیمارستان قائم برای استخراج اطلاعات لازم استفاده شد. محرمانگی اطلاعات هویتی و بالینی بیمار به طور کامل حفظ شده است.

کد و تاریخ مجوز کمیته اخلاق

این پایان نامه براساس طرح پژوهشی شماره ۴۰۱۰۲۸۸ مصوب تاریخ ۱۴۰۱/۰۹/۲۳ و مجوز کمیته اخلاق شماره IR.MUMS.MEDICAL.REC.1401.520 مصوب تاریخ ۱۴۰۱/۰۹/۰۱ با عنوان " بررسی تعداد حذف اگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم (عج) و جهاد دانشگاهی مشهد جهت کمک به درمان این بیماران " انجام شده است.

کد و تاریخ ثبت در IRCT

ندارد.



یافته ها

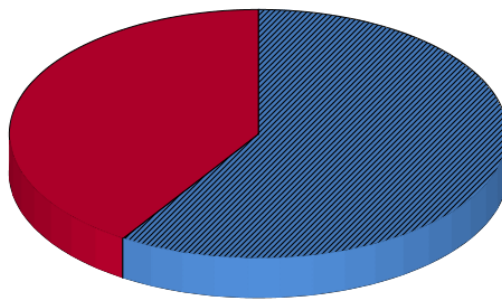
در مطالعه ی حاضر، تعداد ۳۳۳ بیمار مبتلا به بیماری SMA مراجعه کننده به درمانگاه نورورژنتیک بیمارستان قائم (عج) شهر مشهد وارد مطالعه شده و از نظر حذف ژن SMN1 تحت بررسی مولکولی قرار گرفتند. از بین بیماران، تعداد ۱۳۶ نفر (۴۰,۸ درصد) مذکر بودند. تعداد ۲۳۴ نفر بالای ۱۸ سال و ۹۹ نفر زیر ۱۸ سال بودند. تعداد ۲۵ نفر (۷,۵ درصد) مبتلا به SMA نوع ۱، تعداد ۹ نفر (۲,۷ درصد) مبتلا به SMA نوع ۲، تعداد ۱۶۷ نفر (۵۰,۲ درصد) مبتلا به SMA نوع ۳ و ۹۷ نفر (۲۹,۱ درصد) مبتلا به SMA نوع ۴ بودند. در تشخیص پیش از تولد، در مجموع ۳۵ مورد (۱۰,۵ درصد) مبتلا به SMA نوع ۰ یافت شد. در مجموع حذف اگزون ۷ در ۱۷۵ نفر از بیماران تشخیص داده شد. جدول ۳ توزیع بیماران را بر اساس سن، جنس و نوع بیماری و حذف اگزون ۷ نشان می دهد. نمودار ۱ فراوانی بیماران مبتلا به بیماری SMA را بر اساس جنسیت نشان می دهد.

جدول ۳: توزیع بیماران مورد مطالعه بر اساس سن، جنس و نوع بیماری و حذف اگزون ۷

متغیر	تعداد (درصد)
جنسیت	زن
	۱۹۷ (۵۹,۲٪)
سن	مرد
	۱۳۶ (۴۰,۸٪)
حذف اگزون ۷	زیر ۱۸ سال
	۹۹ (۲۹,۷٪)
نوع بیماری	۱۸ سال و بالاتر
	۲۳۴ (۳۰,۷٪)
نوع ۰	دارد
	۱۷۵ (۵۲,۵٪)
نوع ۱	ندارد
	۱۵۸ (۴۷,۵٪)
نوع ۲	نوع ۰
	۳۵ (۱۰,۵٪)
نوع ۳	نوع ۱
	۲۵ (۷,۵٪)
نوع ۴	نوع ۲
	۹ (۲,۷٪)
	نوع ۳
	۱۶۷ (۵۰,۲٪)
	نوع ۴
	۹۷ (۲۹,۱٪)



زن
مرد



نمودار ۱: فراوانی بیماران مبتلا به بیماری SMA بر اساس جنسیت

جدول ۴ توزیع فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس جنسیت را نشان می دهد. در جمعیت مردان، بیشترین فراوانی مربوط به حذف هتروزیگوت اگزون ۷ (۶۶ نفر) و کمترین فراوانی مربوط به حذف هتروزیگوت اگزون ۷ و ۸ (۰ نفر) بود. در جمعیت زنان، بیشترین فراوانی مجدد مربوط به حذف هتروزیگوت اگزون ۷ (۶۲ نفر) و کمترین فراوانی مربوط به حذف هموزیگوت اگزون ۷ (۱۶ نفر) بود.

جدول ۴: توزیع فراوانی حذف اگزون ۷ به تفکیک نوع حذف در بیماران مبتلا به SMA بر اساس جنسیت

	حذف اگزون ۷	عدم حذف اگزون ۷		حذف هر دو اگزون ۷ و ۸	عدم حذف در اگزون ۷ و ۸	کل
	هموزیگوت	هتروزیگوت	هموزیگوت	هتروزیگوت		
مرد	۲	۶۶	۲۱	۴۱	۶	۱۳۶
زن	۱۶	۶۲	۲۴	۴۷	۱۹	۱۹۷
کل	۱۴۶	۱۳۳	۲۹	۲۵	۲۳۳	
	(۴۳,۸٪)	(۳۹,۹٪)	(۷,۸٪)	(۵,۷٪)		

جدول ۵ توزیع فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس سن را نشان می دهد. در جمعیت زیر ۱۸ سال، بیشترین فراوانی مربوط به عدم حذف هموزیگوت اگزون ۷ (۳۱ نفر) و کمترین فراوانی مربوط به عدم حذف هتروزیگوت اگزون ۷ (۳ نفر) بود. در گروه سنی ۱۸ سال و بالاتر، بیشترین فراوانی مربوط به حذف هتروزیگوت اگزون ۷ (۱۱۲ نفر) و کمترین فراوانی مربوط به عدم حذف اگزون ۷ و ۸ (۰ نفر) بود.

جدول ۵: توزیع فراوانی حذف اگزون ۷ به تفکیک نوع حذف در بیماران مبتلا به SMA بر اساس سن

حذف اگزون ۷	عدم حذف اگزون ۷	حذف هر دو اگزون ۷ و ۸	عدم حذف در اگزون ۷ و ۸	کل				
					هموزیگوت	هتروزیگوت	هموزیگوت	هتروزیگوت
زیر ۱۸ سال	۵	۱۶	۳۱	۳	۱۹	۲۵	۹۹	(۲۹,۷٪)
۱۸ سال و بالاتر	۱۳	۱۱۲	۱۴	۸۵	۱۰	۰	۲۳۴	(۷۰,۳٪)
کل	۱۴۶	۱۳۳	۲۹	۲۵	۲۳۳	(۱۰۰٪)	(۵,۷٪)	(۴۳,۸٪)

جدول ۶ توزیع فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس نوع بیماری را نشان می دهد. در بیماران مبتلا به SMA نوع ۰، حذف اگزون ۷ در ۳ مورد مشاهده شد که همگی از نوع حذف هموزیگوت بودند. در این گروه عدم حذف اگزون ۷ نیز در ۳ نفر مشاهده شد که آنها نیز همگی از نوع هموزیگوت بودند. در بیماران مبتلا به SMA نوع ۱، حذف اگزون ۷ فقط در ۱ مورد مشاهده شد که از نوع حذف هموزیگوت بود. در این گروه عدم حذف اگزون ۷ در ۱۸ نفر مشاهده شد که آنها نیز همگی از نوع هموزیگوت بودند. در بیماران مبتلا به SMA نوع ۲، حذف اگزون ۷ در ۱ مورد مشاهده شد که از نوع حذف هتروزیگوت بود. در این گروه عدم حذف اگزون ۷ نیز در ۴ نفر مشاهده شد که ۳ مورد آن از نوع هموزیگوت بود. در بیماران مبتلا به SMA نوع ۳، حذف اگزون ۷ در ۸۹ مورد مشاهده شد که ۸۲ مورد آن از نوع حذف هتروزیگوت بودند. در این گروه عدم حذف اگزون ۷ در ۶۸ مورد مشاهده شد که ۵۶ مورد آن از نوع هتروزیگوت بودند. در بیماران مبتلا به SMA نوع ۴، حذف اگزون ۷ در ۵۲ مورد مشاهده شد که ۴۵ مورد آن از نوع حذف هتروزیگوت بودند. در این گروه عدم حذف اگزون ۷ در ۴۰ مورد مشاهده شد که ۳۱ مورد آن از نوع هتروزیگوت بودند.

همچنین حذف هر دو اگزون ۷ و ۸ در ۱۶ مورد از بیماران SMA نوع ۰، در ۸ مورد از بیماران SMA نوع ۳ و در ۵ مورد از بیماران SMA نوع ۴ وجود داشت. عدم حذف در اگزون ۷ و ۸ در ۱۳ مورد از بیماران SMA نوع ۰، ۶ مورد از بیماران SMA نوع ۱، ۴ مورد از بیماران SMA نوع ۲ و ۲ مورد از بیماران SMA نوع ۳ دیده شد.

جدول ۶: توزیع فراوانی حذف اگزون ۷ به تفکیک نوع حذف در بیماران مبتلا به SMA بر اساس نوع بیماری

نوع	حذف اگزون ۷			عدم حذف اگزون ۷		حذف هر دو اگزون ۷ و ۸	عدم حذف در اگزون ۷ و ۸	کل
	هموزیگوت	هتروزیگوت	هموزیگوت	هموزیگوت	هتروزیگوت			
نوع ۰	۳	۰	۳	۰	۰	۱۶	۱۳	۳۵ (٪۱۰،۵)
نوع ۱	۱	۰	۱۸	۰	۰	۰	۶	۲۵ (٪۷،۵)
نوع ۲	۰	۱	۳	۱	۱	۰	۴	۹ (٪۲،۷)
نوع ۳	۷	۸۲	۱۲	۵۶	۱۶۷	۸	۲	۱۶۷ (٪۵۰،۲)
نوع ۴	۷	۴۵	۹	۳۱	۹۷	۵	۰	۹۷ (٪۲۹،۱)
کل	۱۴۶ (٪۴۳،۸)		۱۳۳ (٪۴۰)		۲۹ (٪۸،۷)	۲۵ (٪۷،۵)	۳۳۳ (٪۱۰۰)	

جدول ۷ مقایسه فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس جنسیت را نشان می دهد. بر اساس این جدول، تفاوت معنی داری بین زنان و مردان از لحاظ حذف اگزون ۷ مشاهده نشد ($P=0.254$).

جدول ۷: مقایسه فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس جنسیت

حذف اگزون ۷	عدم حذف اگزون ۷	کل	مقدار P
مرد	۶۸	۶۸	۰،۲۵۴
زن	۱۰۷	۱۹۷	
کل	۱۷۵	۳۳۳	

جدول ۸ مقایسه فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس سن را نشان می دهد. بر اساس این جدول، تفاوت معنی داری بین افراد بالای ۱۸ سال و زیر ۱۸ سال از لحاظ حذف اگزون ۷ وجود داشت ($P=0.003$).



جدول ۸: مقایسه فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس سن

حذف اگزون ۷	عدم حذف اگزون ۷	کل	مقدار P
۴۰	۵۹	۹۹	۰,۰۰۳
۱۳۵	۹۹	۲۳۴	
۱۷۵	۱۵۸	۳۳۳	
زیر ۱۸ سال			
۱۸ سال و بالاتر			
کل			

جدول ۹ مقایسه فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس نوع بیماری را نشان می دهد. بر اساس این جدول، تفاوت معنی داری بین انواع مختلف بیماری از لحاظ فراوانی حذف اگزون ۷ وجود داشت ($P > 0,001$).

جدول ۹: مقایسه فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس نوع بیماری

حذف اگزون ۷	عدم حذف اگزون ۷	کل	مقدار P
۱۹	۱۶	۳۵	$P > 0,001$
۱	۲۴	۲۵	
۱	۸	۹	
۹۷	۷۰	۱۶۷	
۵۷	۴۰	۹۷	
۱۷۵	۱۵۸	۳۳۳	
نوع ۰			
نوع ۱			
نوع ۲			
نوع ۳			
نوع ۴			
کل			



بحث

یافته اصلی

در مطالعه حاضر که با هدف بررسی تعداد حذف اگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژیک بیمارستان قائم (عج) و جهاد دانشگاهی مشهد جهت کمک به درمان این بیماران انجام گرفت، در مجموع تعداد ۳۳۳ بیمار مبتلا به SMA وارد مطالعه شده و از نظر حذف ژن SMN تحت بررسی مولکولی بررسی قرار گرفتند.

از بین بیماران، ۴۰٫۸ درصد مذکر بودند. تعداد ۲۳۴ نفر بالای ۱۸ سال بودند. تعداد ۲۵ نفر (۷٫۵ درصد) مبتلا به SMA نوع ۱، تعداد ۹ نفر (۲٫۷ درصد) مبتلا به SMA نوع ۲، تعداد ۱۶۷ نفر (۵۰٫۲ درصد) مبتلا به SMA نوع ۳ و ۹۷ نفر (۲۹٫۱ درصد) مبتلا به SMA نوع ۴ بودند. در تشخیص پیش از تولد، در مجموع ۳۵ مورد (۱۰٫۵ درصد) مبتلا به SMA نوع ۰ یافت شد. حذف اگزون ۷ در ۱۷۵ نفر از بیماران تشخیص داده شد. تفاوت معنی داری بین گروه های مختلف بیماری و گروه های سنی از لحاظ حذف اگزون ۷ یافت شد.

مقایسه با مطالعات مشابه

در مطالعه حاضر، در خصوص حذف اگزون ۷ به تنهایی، فراوانی حذف هتروزیگوتی آن در بین بیماران SMA نوع ۳ و ۴ بیشتر از حذف هموزیگوتی بود. فراوانی حذف هموزیگوتی اگزون ۷ در SMA نوع ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۳، ۱، ۰، ۷ و ۷ بیمار بود. در مطالعه ی ونگ^۵ و همکاران که با هدف بررسی حذف ژن SMN در بیماران مبتلا به SMA بدون علامت انجام شد، فراوانی حذف هموزیگوتی اگزون ۷ در SMA نوع ۱، ۲، ۳ به ترتیب ۲، ۷ و ۳ بود (۱۲) که تقریباً مشابه با نتایج مطالعه ما می باشد. در مطالعه دیگری که در دانشگاه اوهایو بر روی ۶۱۰ بیمار مبتلا به SMA انجام شد، فراوانی حذف اگزون ۷ به تنهایی ۴٫۸ درصد گزارش شد که از فراوانی حذف هموزیگوت اگزون ۷ در مطالعه ما کمتر بود (۱۳). در حالیکه فراوانی هموزیگوتی حذف اگزون ۷ در ژن SMN1 در SMA نوع ۱، ۲ و ۳ در مطالعه نجم آبادی و همکاران، ۹۴ درصد بود که با نتایج مطالعه ما متفاوت و قابل توجه است. از تفاوت های دیگر این مطالعه حجم نمونه کمتر آن در مقایسه با مطالعه ما (۲۴۳ در مقابل ۳۳۳) و همچنین عدم بررسی اگزون ۸ بود که می تواند بر نتایج مطالعه اثرگذار باشد. نتایج مطالعه نجم آبادی و همکاران مشابه نتایج بدست آمده در مطالعات مشابه در کشورهای ژاپن چین و کویت می باشد (۱۴). فراوانی این حذف در سایر کشور ها همچون مالزی و هند کمتر و در حدود ۸۰ درصد گزارش شده است (۱۵، ۱۶). به نظر می رسد تفاوت ها در میزان فراوانی حذف اگزون ۷ ژن SMN1 بین بیماران در جمعیت های متفاوت، احتمالاً به فراوانی یک جهش خاص در یک جمعیت خاص مربوط می شود.

⁵ Wang

در مطالعه ما عدم حذف اگزون ۷ به تنهایی و عدم حذف اگزون ۷ و ۸ در بین بیماران مورد مطالعه به ترتیب ۴۰ درصد و ۷٫۵ درصد و در مجموع ۴۷٫۵ درصد بود. در مطالعه میلمن^۶ و همکاران در ۵۷٫۲٪ بیماران هیچگونه حذفی در ژن SMN1 وجود نداشت (13). حجم نمونه این مطالعه تقریباً مشابه بیماران مورد مطالعه ما بود (۳۶۶ در مقابل ۳۳۳) و روش استفاده شده نیز روش PCR بود.

همچنین حذف شدگی هر دو اگزون ۷ و ۸ در مجموع در ۸٫۷ درصد از بیماران مطالعه‌ی ما رخ داده بود در حالی که در مطالعه‌ی جبارپور و همکاران در بیماران SMA منطقه آذربایجان شرقی که از تکنیک مشابه مطالعه ما استفاده شده بود، این عدد ۳۰٫۴ درصد گزارش شد (۱۷). در مطالعه Vijzelaar و همکاران که در سال ۲۰۱۹ تحت عنوان فراوانی انواع ژن SMN فاقد اگزون ۷ و ۸ وابسته به جمعیت، ۱۲۵۵ نمونه از پروژه ۱۰۰۰ ژنوم با استفاده از نسخه جدیدی از پروب میکس (P021MLPA) که هر اگزون SMN را پوشش می‌دهد، آزمایش شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که نوع SMN فاقد اگزون‌های ۷ و ۸ در ۲۰ درصد افراد در چندین جمعیت قفقازی وجود داشت، در حالی که تقریباً در جمعیت‌های مختلف آسیایی و آفریقایی وجود نداشت (۱۸). این عدد همچنین در کشور آمریکا ۳۸ درصد گزارش شد که از نتایج مطالعه ما بالاتر و نشان‌دهنده تفاوت‌های ژنتیکی در کشورهای مختلف و همچنین در مناطق مختلف یک کشور می‌باشد. این موضوع عدم اکتفا به علائم بالینی بیماران و نیاز به بررسی‌های مولکولی را روشن‌تر می‌سازد.

سایر نکات قابل بحث

با توجه به میزان بالای ازدواج‌های خویشاوندی در ایران، بیماری‌های ژنتیکی با توارث مغلوب شیوع بالایی دارد. به همین جهت بیماری SMA یکی از علل مهم و اصلی بیماری و مرگ و میر در میان نوزادان و کودکان ایرانی می‌باشد. این بیماری پس از دیستروفی عضلانی دوشن، یکی از شایعترین بیماری‌های عصبی-عضلانی محسوب می‌گردد. اکثر بیماران SMA با حذف‌های اگزون ۷ و/یا ۸ ژن SMN1 مشخص می‌شوند. جهش در ژن SMN1 مهم‌ترین عامل در ابتلا به بیماری SMA بوده اما در شدت بیماری اثری ندارد (۹، ۱۹، ۲۰). بر اساس مطالعات انجام شده توسط لفبوره^۷ و همکارانش در سال ۱۹۹۵، مشخص شده است که در حدود ۹۸٫۶ درصد از بیماران مبتلا به SMA حذف شدگی در ژن SMN وجود دارد (9). در این میان بیش از ۹۰ درصد بیماران تیپ ۱ و ۲ در جمعیت‌های مختلف از جمله ایالات متحده، آلمان، ایتالیا و چین دارای حذف شدگی در اگزون ۷ و ۸ می‌باشند. البته درصدهای کمتر حذف شدگی همانگونه که در مطالعه ما دیده شد، در سایر مطالعات نیز وجود دارد (21). لذا، ایجاد دارویی که موجب جلوگیری از حذف اگزون ۷ در ژن SMN شود در درمان بیماران موثر و حیاتی خواهد بود. در دسامبر سال ۲۰۱۶، سازمان غذا و دارو (FDA) اولین و تنها داروی درمانی موثر با نام اسپینرازا (SPINRAZA) در درمان بیماران SMA را تأیید کرد (22). این دارو در درمان انواع SMA در اروپا، کانادا، ژاپن،

⁶ Mailman

⁷ Lefebvre



استرالیا و ایالات متحده آمریکا تایید شده است. اسپینرازا یک الیگونوکلوئوتید اصلاح شده است که به یک توالی خاص در پایین دست اگزون ۷ روی اسید ریبونوکلیک پیش پیام رسان (pre-mRNA) ژن SMN2 متصل می شود. این امر رونوشت mRNA SMN2 را تعدیل می کند و در نهایت موجب افزایش رونوشت از اگزون ۷ را و در نتیجه تولید پروتئین SMN را افزایش می دهد. اسپینرازا با تزریق داخل نخاعی با دوز معادل ۱۲ میلی گرم (۴-۵ میلی لیتر بر اساس سن)، با سه دوز اولیه در فواصل ۱۴ روز و یک دوز چهارم ۳۰ روز بعد تجویز می شود (۲۳). پس از تزریق داخل نخاعی، اسپینرازا از مایع مغزی نخاعی (CSF) در سراسر CNS، از جمله در نورون های حرکتی، گلیا و سلول های اندوتلیال عروقی توزیع می شود. اسپینرازا از CSF به گردش خون سیستمیک مطابق با گردش نرمال CSF، با میانگین زمان تا حداکثر غلظت پلاسما بین ۱,۷ تا ۶ ساعت پاک می شود. این دارو ۱۵ تا ۱۶۸ روز پس از مصرف دارو همچنان در CSF قابل تشخیص بوده و با میانگین نیمه عمر حذف نهایی ۱۳۵ تا ۱۷۷ روز در CSF و ۶۳ تا ۸۷ روز در پلاسما، که نشان دهنده مواجهه طولانی مدت CNS و بافت های محیطی با اسپینرازا است (۲۴، ۲۵). گزارش شده است که برای حفظ اثرات این دارو، بیماران نیاز به تزریق مکرر دارو دارند که این موضوع برای همه مقرون به صرفه نیست. به عنوان مثال، هزینه اسپینرازا برای هر بیمار ۷۵۰۰۰۰ دلار برای سال اول درمان و حدود ۳۷۵۰۰۰ دلار برای هر بیمار هر سال پس از آن خواهد بود (۲۶). با توجه به اینکه هم اکنون بیماران مبتلا به SMA نوع ۱ در مشهد تحت درمان با داروی اسپینرازا می باشند، مطالعه ی حاضر می تواند گام موثری در جهت ارزیابی شیوع این نوع بیماری باشد و همچنین مشخص کند آیا استفاده از این داروی گرانقیمت در درمان بیماران SMA قابل توجیه است یا خیر. همچنین، در مطالعه ما، فراوانی حذف اگزون ۷ در بیماران مبتلا به SMA بر اساس نوع بیماری به طرز معناداری تفاوت داشت. این تفاوت همچنین در گروه های مختلف سنی نیز وجود داشت و فراوانی حذف اگزون ۷ به طرز معناداری در افراد ۱۸ سال و بالاتر بیشتر بود. با توجه به این موارد، مطالعه ی حاضر می تواند گام موثری در جهت شناسایی بیمارانی باشد که داروی جدید اسپینرازا میتواند در درمان و بهبود آنان باشد.

کاربرد/کاربست

بر اساس یافته های حاصل از این پژوهش، روش بررسی DNA به عنوان یک روش قابل اتکا، سریع و غیر تهاجمی به طور قابل ملاحظه ای به تایید بیماری SMA به خصوص در بیمارانی با علائم غیر معمول و نتایج غیرعادی در نمونه برداری عضله کمک می کند. همچنین تشخیص حذف اگزون حذف در ژن SMN1 در کودک مبتلا و دارای علائم بالینی به عنوان تشخیص مورد قبول بوده و نیاز به بررسی های تهاجمی از جمله نمونه برداری عضله را کمتر می کند. همچنین با استفاده از روش های مولکولی و تشخیص پیش از تولد میتوان از تولد نوزادان مبتلا به SMA جلوگیری کرده و به این ترتیب بار مالی و روانی وارده بر خانواده و نظام سلامت را کاهش داد. به علاوه، از آنجایی که درصد بالایی از مبتلایان به بیماری SMA حاصل ازدواج های فامیلی و خویشاوندی اند، آگاه سازی



جامعه به منظور کاهش ازدواج‌های فامیلی (به خصوص در مناطق روستایی) و همچنین مشاوره‌های ژنتیک پیش از ازدواج می‌تواند از بروز نوزادان مبتلا به این بیماری را در سطح جامعه کاهش دهد.

محدودیتها و نقاط ضعف و قوت

از محدودیت‌های مطالعه حاضر تعداد کم حجم نمونه و تک مرکزی بودن محل جمع‌آوری نمونه می‌باشد.

پیشنهادهای

پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با حجم نمونه بیشتر و از مراکز درمانی متعددتر انجام پذیرد تا نتایج حاصل از آن‌ها قابلیت تعمیم‌پذیری بیشتری به کلیت جامعه داشته باشد.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های مولکولی ژن SMN1 در تشخیص بیماری SMA ضروری بوده و امکان تشخیص دقیق موارد مبتلا و ناقل را فراهم می‌آورد. با توجه به اینکه همچنان درمان قطعی برای این بیماری وجود ندارد، و بیماران مبتلا به SMA نوع ۱ در مشهد هم‌اکنون تحت درمان با داروی اسپینرازا می‌باشند، به نظر می‌رسد به جای درمان این بیماران با داروی‌هایی با هزینه‌های سرسام‌آور همچون اسپین رازا، منطقی‌ترین و قابل‌توجیه‌ترین راه آگاه‌سازی خانواده‌ها و جوامع جهت اجتناب از ازدواج‌های فامیلی و همچنین تشخیص زودهنگام این بیماران با روش‌های مناسب و در صورت لزوم سقط به موقع آنان است. این موضوع هم از تولد نوزادان مبتلا به SMA جلوگیری کرده و هم هزینه سرسام‌آور استفاده از داروهایی که درمان قطعی این بیماری نیستند (همچون اسپین رازا) به خانواده‌ها و نظام سلامت کشور را کاهش می‌دهد. مطالعات مشابه بیشتری در تایید این موضوع مورد نیاز می‌باشد.



پیام پژوهش به جامعه

با توجه به شیوع بالای ازدواج های فامیلی در ایران و از آنجایی که درصد بالایی از مبتلایان به بیماری SMA حاصل ازدواج های فامیلی و خویشاوندی اند، توصیه به بررسی های مولکولی به عنوان روشی کم خطر، سریع و غیر تهاجمی جهت شناسایی زود هنگام این بیماران میشود. همچنین، همچنین در موارد مشکوک و با تشخیص و توصیه ی پزشک، توصیه به انجام مشاوره های ژنتیک پیش از ازدواج می شود تا از بروز نوزادان مبتلا به این بیماری را در سطح جامعه جلوگیری شود.

دستاورد و نحوه بکار گیری نتیجه پژوهش

نتایج مطالعه حاضر میتواند یک تصویر کلی از بررسی DNA بیماران SMA و میزان جهش در ژن SMN1 در بین مبتلایان به بیماری SMA در شهر مشهد را نشان دهد. این موضوع در بکار گیری درست داروهایی چون اسپین رازا و داروهایی که در آینده وارد بازار دارویی خواهند شد بسیار موثر و کاربردی خواهد بود. همچنین بر اساس یافته های حاصل از این پژوهش، روش بررسی DNA به عنوان یک روش قابل اتکا، سریع و غیر تهاجمی به طور قابل ملاحظه ای به تایید بیماری SMA به خصوص در بیمارانی با علائم غیر معمول و نتایج غیرعادی در نمونه برداری عضله کمک می کند و نیاز به روش های تهاجمی در تشخیص بیماری SMA را کمتر خواهد کرد.

کد اولیت و ماخذ:



حمایت کنندگان

این پژوهش با حمایت دانشگاه علوم پزشکی مشهد و درمانگاه نورولوژی بیمارستان قائم (عج) و جهاد دانشگاهی شهر مشهد انجام شده است.

تضاد منافع

هیچ تضاد منافی وجود ندارد.



1. Russman BS. Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *Journal of child neurology*. 2007;22(8):946-51.
2. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human mutation*. 2000;15(3):228-37.
3. Lefebvre S, Bürglen L, Frézal J, Munnich A, Melki J. The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics*. 1998;7(10):1531-6.
4. 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. *Human molecular genetics*. 1996;5(2):257-63.
5. Ross LF, Kwon JM. Spinal Muscular Atrophy: Past, Present, and Future. *NeoReviews*. 2019;20(8):e437-e51.
6. Panigrahi I, Kesari A, Phadke SR, Mittal B. Clinical and molecular diagnosis of spinal muscular atrophy. *Neurology India*. 2002;50(2):117-22.
7. Nishio H, Niba ETE, Saito T, Okamoto K, Takeshima Y, Awano H. Spinal muscular atrophy: the past, present, and future of diagnosis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(15):11939.
8. Kim C, Passos-Bueno MR, Marie S, Cerqueira A, Conti U, Marques-Dias M, et al. Clinical and molecular analysis of spinal muscular atrophy in Brazilian patients. *Genetics and Molecular Biology*. 1999;22:487-92.
9. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80(1):155-65.
10. Butchbach ME. Genomic variability in the survival motor neuron genes (SMN1 and SMN2): Implications for spinal muscular atrophy phenotype and therapeutics development. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(15):7896.
11. Kolb SJ, Kissel JT. Spinal muscular atrophy. *Neurologic clinics*. 2015;33(4):831-46.
12. Wang CH, Xu J, Carter TA, Ross BM, Dominski MK, Bellcross CA, et al. Characterization of survival motor neuron (SMNT) gene deletions in asymptomatic carriers of spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics*. 1996;5(3):359-65.
13. Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Wirth B, et al. Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genetics in Medicine*. 2002;4(1):20-6.
14. Najmabadi H. Surveying SMN gene deletions in Iranian patients with spinal muscular atrophy and prenatal diagnosis. *Medical Science Journal of Islamic Azad University-Tehran Medical Branch*. 2007;17(3):121-6.
15. Watihiyati MS, ZABIDI-HUSSIN AM, Tang TH, Matsuo M, Nishio H. Deletion analyses of SMN1 and NAIP genes in Malaysian spinal muscular atrophy patients. *Pediatrics International*. 2007;49(1):11-4.
16. Kesari A, Idris MM, Chandak GR, Mittal B. Genotype-phenotype correlation of SMN locus genes in spinal muscular atrophy patients from India. *Experimental & Molecular Medicine*. 2005;37(3):147-54.
17. مرتضی ج، امید ع، هرمز آ، فرحناز رف، نادر لز. تشخیص و غربال گری بیماری آتروفی عضلانی-نخاعی نوع سه با استفاده از تکنیک PCR-RFLP ۱۳۸۴ تا ۱۳۸۳ سال طی منطقه آذربایجان شرقی. *در منطقه آذربایجان شرقی طی سال ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۴*.
18. Vijzelaar R, Snetselaar R, Clausen M, Mason AG, Rinsma M, Zegers M, et al. The frequency of SMN gene variants lacking exon 7 and 8 is highly population dependent. *PLoS One*. 2019;14(7):e0220211.
19. Didonato CJ, Ingraham SE, Mendell JR, Prior TW, Lenard S, Moxley III RT, et al. Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1997;41(2):230-7.
20. Chang J-G, Jong Y-J, Huang J-M, Wang W-S, Yang T-Y, Chang C-P, et al. Molecular basis of spinal muscular atrophy in Chinese. *American journal of human genetics*. 1995;57(6):1503.
21. Brzustowicz L, Ricketts A, HAUSMANOWAPETRUSEWICZ I, editors. EXTENDED HAPLOTYPE ANALYSIS AND DELETIONS IN THE SMN GEN IN POLISH FAMILIES WITH SPINAL MUSCULAR-ATROPHY. *AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS*; 1995: UNIV CHICAGO PRESS 5720 S WOODLAWN AVE, CHICAGO, IL 60637.
22. Pacione M, Siskind CE, Day JW, Tabor HK. Perspectives on Spinraza (Nusinersen) treatment study: views of individuals and parents of children diagnosed with spinal muscular atrophy. *Journal of Neuromuscular Diseases*. 2019;6(1):119-31.
23. Shorrock HK, Gillingwater TH, Groen EJ. Overview of current drugs and molecules in development for spinal muscular atrophy therapy. *Drugs*. 2018;78(3):293-305.
24. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsaar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet*. 2016;388(10063):3017-26.
25. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*. 2016;86(10):890-7.
26. Bozorg Qomi S, Asghari A, Salmaninejad A, Mojarad M. Spinal Muscular Atrophy and Common Therapeutic Advances. *Fetal and Pediatric Pathology*. 2019;38(3):226-38.







تشکرها

لازم می دانم از **آقای/خانم دکتر ...** که به عنوان استاد راهنما که در تمام مراحل انجام این پژوهش مرا یاری نمودند، قدردانی ویژه کنم. **خانم/آقای دکتر ...!** نکاتی که به من آموختید را هرگز فراموش نخواهم کرد.

از همکاری پرسنل محترم کلینیک نورولوژیک بیمارستان قائم و جهاد دانشگاهی شهر مشهد در انجام این پژوهش قدردانی می کنم.

در نهایت اما نه کمتر از دیگران، پدر و مادر عزیز و مهربانم از شما که در تمامی مراحل زندگی همراه من بودید سپاس گذارم و دستان مهربان شما را می بوسم .



تعهدنامه

اینجانب فرزانه خلیلیان دانشجوی دوره دکتری حرفه ای دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد نویسنده پایان نامه " بررسی تعداد حذف اگزون هفت در ژن SMN1 در بیماران مبتلا به آتروفی عضلانی نخاعی مراجعه کننده به درمانگاه نورولوژیک بیمارستان قائم (عج) و جهاد دانشگاهی مشهد جهت کمک به درمان این بیماران " به همراه اساتید راهنما و مشاور خود متعهد میشویم:

- ✓ تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب و تحت راهنمایی اساتید راهنما و مشاور انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- ✓ در استفاده از نتایج پژوهشهای پژوهشگران دیگر به مرجع مورد استفاده استناد کرده‌ام.
- ✓ مطالب مندرج در پایان نامه توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- ✓ کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه علوم پزشکی مشهد است و کلیه مقالات، کتب، اختراعات و ... مستخرج، با نام "دانشگاه علوم پزشکی مشهد" منتشر شده و / یا منتشر خواهد شد.
- ✓ حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج پایان نامه تاثیر گذار بوده‌اند را در مقالات مستخرج رعایت کنیم. از سوی دیگر نام هیچ فردی به سبب دلایل غیرعلمی در مقالات ذکر نخواهد شد.
- ✓ در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی داشته یا از آنها استفاده کرده‌ام، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق پژوهشی را رعایت نموده‌ام.
- ✓ کلیه مراحل اصلی این پژوهش براساس یک طرح پژوهشی و پس از تصویب آن در معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه و کمیته اخلاق انجام شده است.
- ✓ همه ما متن پایان نامه را خوانده و بازنگری کرده ایم و متن نهایی مورد تایید ماست.
- ✓ مسوولیت کلیه مراحل پژوهش و کلیه موارد مندرج در این پایان نامه را می‌پذیریم.
- ✓ چنانچه در هر مقطع زمانی خلاف موارد فوق ثابت شود، عواقب ناشی از آن را می‌پذیرم و دانشگاه مجاز است مطابق مقررات رفتار نموده و به ابطال مدرک تحصیلی اخذ شده اقدام نماید.

تاریخ

دانشجو (نام و نام خانوادگی و امضا)

اساتید مشاور (نام و نام خانوادگی و امضا)

اساتید راهنما (نام و نام خانوادگی و امضا)

Objective: Spinal muscular atrophy (SMA) is a group of autosomal recessive diseases related to motor neurons. In most patients, SMN1 is likely to be deleted in exons 7 or 8. Therefore, it is important to investigate the mutations of this gene in order to identify the patients and carry out the most effective drug treatment. The aim of this study was to investigate the mutations of both exons of the mentioned gene in patients with SMA.

Methods & Materials: In this cross-sectional study, patients with SMA who visited the neurology clinic of Ghaem Hospital located in Mashhad, northeast of Iran between 2017 and 2022 were included. After classifying the patients based on the SMA consortium criteria, the DNA from the patients' blood samples were extracted and then molecular studies were performed for SMN1 gene mutations by PCR-RFLP methods. All data analysis was performed using SPSS version 26.0. P-values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results: Medical records related to 333 patients with SMA were included in the study. Of them, 40.8% were male. 234 subjects were over 18 years old. 25 people (7.5%) have SMA type 1, 9 people (2.7%) have SMA type 2, 167 people (50.2%) have SMA type 3 and 97 people (29.1 percent) had SMA type 4. In prenatal diagnosis, a total of 35 cases (10.5%) were found with SMA type 0. Deletion of exon 7 was detected in 175 patients. A significant difference was found between different disease groups ($P < 0.001$) and age groups ($P = 0.003$) in terms of exon 7 deletion.

Conclusion: The results of the present study can show a general picture of the DNA examination of SMA patients and the mutation rate in the SMN1 gene among SMA patients in Mashhad. This issue will be effective and practical in the appropriate use of medications such as Spinraza and other medications that will enter the pharmaceutical market in the future.

Keywords: spinal muscular atrophy, SMN1, exon 7



Mashhad University of Medical Sciences
Faculty of medicine

Examining the number of exon seven deletions in the SMN1 gene in patients with spinal muscular atrophy referred to the Neurological Clinic of Jihad and Qaem Hospital of Mashhad in order to facilitate the treatments of these patients

By:

Farzaneh Khalilian

Under Supervision of:

Dr. ...

Dr. ...

Adviser:

Dr. ...

Dr. ...

Thesis number: ...

December 2023

