

## ژن های عامل بیماری ادرار شربت افرا، پاتو مکانیسم مولکولی بیماری و جهش های جمعیت ایران

نسیم گرچی زاده (BSc)<sup>۱</sup>، امید جزایری (PhD)<sup>۲\*</sup>، سعید نژادوند (PhD)<sup>۱</sup>، مرتضی علیجانپور (MD)<sup>۲</sup>

۱- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابل، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیماریهای غیرواگیر کودکان، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

دریافت: ۹۷/۴/۱۵، اصلاح: ۹۷/۵/۱۲، پذیرش: ۹۷/۹/۲۷

### خلاصه

**سابقه و هدف:** بیماری ادرار شربت افرا (MSUD) یک اختلال متابولیک مادرزادی است که به علت نقص در کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه دار به وجود آمده و موجب تجمع اسیدآمینه های شاخه دار در مایعات بدن می شود. این کمپلکس توسط ۴ ژن هسته ای *BCKDHA*، *BCKDHB*، *DBT*، *DLD* کد شده و اختلال در هر یک از این ژنها باعث بروز این بیماری می شود. تجمع متابولیت ها منجر به اختلال در متابولیسم انرژی، تحریک آپوپتوز، اختلال در سنتز نوروترانسمیترها و در نهایت ایجاد علائم عصبی مانند تشنج، اختلال شناختی حرکتی و کما می گردد. در این مطالعه، فراوانی این بیماری و جهش های آن در جمعیت ایران مورد بررسی قرار گرفته و همچنین پاتومکانیسم مولکولی این بیماری توضیح داده خواهد شد.

**مواد و روش ها:** این مطالعه مروری با استفاده از واژه های کلیدی "MSUD" و "Iran" جهت جمع آوری و بررسی سیستماتیک جهش ها در مقالات بدست آمده انگلیسی و فارسی مرتبط با بیماری ادرار شربت افرا بترتیب از پایگاه های داده PubMed و magiran بررسی گردیدند.

**یافته ها:** تعداد ۲۴ جهش مرتبط با بیماری ادرار شربت افرا در ایران مشاهده شد که از این میان ۱۸ جهش تاکنون در سایر نقاط دنیا گزارش نشده است. همچنین مشخص شد فراوانی این بیماری در استان های کشور به دلیل میزان بالای ازدواج های خویشاوندی بالاتر از میانگین جهانی است.

**نتیجه گیری:** شناسایی و جمع آوری جهش های ژنتیکی دخیل در بیماری ادرار شربت افرا در جمعیت ایران می تواند در انجام آزمایشات تشخیصی پره ناتال برای خانواده ها با سابقه خانوادگی ابتلا به این بیماری مفید بوده و تشخیص و درمان به موقع را ممکن سازد.

**واژه های کلیدی:** بیماری ادرار شربت افرا، *BCKDHA*، *BCKDHB*، *DBT*، *DLD*، *PPMIK*

### مقدمه

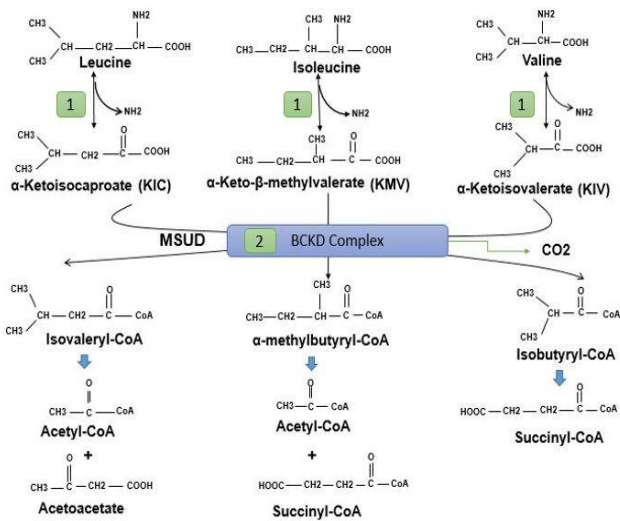
گزارش شده مرتبط با این بیماری در جمعیت ایران به طور سیستماتیک جمع آوری شده و همچنین فراوانی این بیماری در استان های مختلف کشور مورد بررسی قرار گرفته است.

**متابولیسم اسیدهای آمینه شاخه دار:** اسیدآمینه های شاخه دار لوسین، ایزولوسین و والین، اسیدآمینه های ضروری می باشند که توسط بدن ساخته شده و باید از طریق غذا به بدن وارد گردد (۶). *BCAAs* برای سنتز پروتئین، اسیدچرب های شاخه دار و نوروترانسمیترها ضروری و به همین دلیل تنظیم کاتابولیسم این اسیدهای آمینه حائز اهمیت است. کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه دار (*BCKD*; *E.C.*) 1.2.4.4، یک کمپلکس مولتی آنزیم میتوکندریایی است که از سه جز کاتالیک دیکربوکسیلاز  $E_1$  (1.2.4.4 EC)، دی هیدرولیپوپتیل ترانسلاز (*EC*) 2.3.1.168  $E_2$ ، دی هیدرولیپوآمید دهیدروژناز  $E_3$  (1.8.1.4 EC) و دو آنزیم تنظیمی *BCKD* کیناز و *BCKD* فسفاتاز تشکیل شده است (۷-۹) و نقش مهمی در مسیر کاتابولیسم *BCAAs* دارد (شکل ۱) (۱۰).  $E_1$  (شامل دو زیرواحد  $E_1\alpha$  و  $E_1\beta$ )،  $E_2$  و  $E_3$  به ترتیب توسط ژنهای هسته ای *BCKDHA*

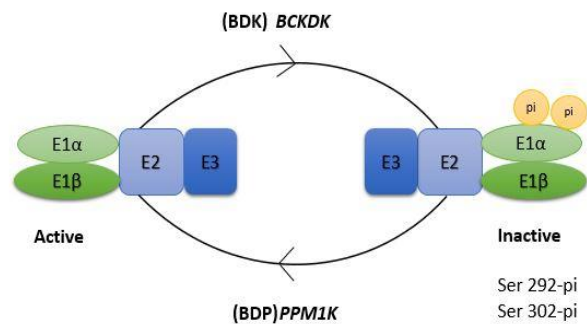
بیماری ادرار شربت افرا (MSUD; OMIM #248600) یک اختلال ژنتیکی نادر با الگوی توارث اتوزومی مغلوب است که به علت نقص در کاتابولیسم سه اسیدآمینه شاخه دار (*BCAAs*) لوسین، ایزولوسین، والین ایجاد می شود (۱۰). این بیماری اولین بار در سال ۱۹۵۴ توسط *Menkes* و همکاران در بیمارستان کودکان بوستون به عنوان یک سندرم در ۴ نوزاد شناسایی شد. نوزادان، دارای اختلال پیشرونده عصبی همراه با بوی خاص ادرار بودند (۳). این بیماری به علت جهش در ۴ ژن *BCKDHA*، *BCKDHB*، *DBT* و *DLD* موجب نقص در کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه دار شده و منجر به تجمع اسیدآمینه های شاخه دار لوسین، ایزولوسین، والین و کتواسیدهای شاخه دار آنها (*BCKAs*) آلفاکتوایزوکاپروآت، آلفاکتوبتامیل والرات، آلفاکتو ایزووالرات در سلول ها و مایعات بدن می شود (۱). از این سه اسیدآمینه، لوسین بیشترین تاثیر را در عملکرد سلولی دارد (۴). تجمع لوسین باعث ایجاد علائم عصبی شده، در حالیکه افزایش ایزولوسین پلاسما باعث ایجاد بوی شربت افرا می شود (۵). در این مطالعه ضمن مرور ژنهای درگیر در بیماری ادرار شربت افرا و پاتومکانیسم مولکولی آنها، جهش های تا کنون

\* مسئول مقاله: دکتر امید جزایری

منجر به غیرفعال شدن کمپلکس BCKDH می‌شود (شکل ۳) (۷ و ۱۱). زمانی که میزان BCAAs زیاد باشد آنزیم BDP کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز را دفسفریله کرده و منجر به فعال سازی دوباره این کمپلکس می‌شود (۱۷-۱۵).



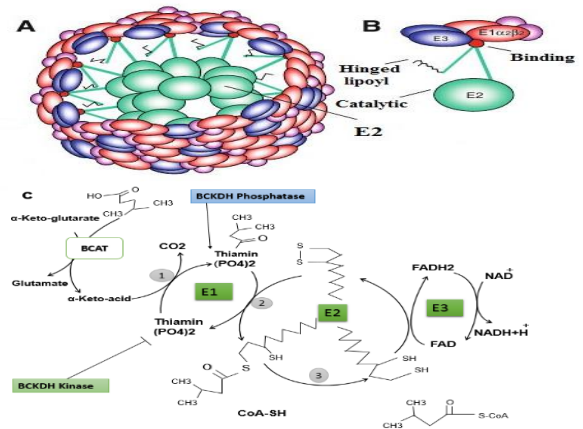
شکل ۲. تجزیه اکسیداتیو اسیدهای آمینه شاخه‌دار لوسین، ایزولوسین و والین، ترانس آمیناسیون اسیدهای آمینه شاخه‌دار توسط آنزیم منفرد آمینوترانسفراز شاخه‌دار کاتالیز می‌شود. از طریق این ترانس آمیناسیون لوسین به آلفایزوکاپروآت، ایزولوسین به آلفاکتو بتا متیل والرات، والین به آلفاکتوایزووالرات تبدیل خواهند شد (واکنش ۱). دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو BCKAs توسط کمپلکس آنزیمی آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار کاتالیز می‌شود (واکنش دوم).



شکل ۳. کمپلکس BCKDH تحت کنترل پس از ترجمه قرار می‌گیرد. این کمپلکس آنزیمی توسط پروتئین کیناز BDK فسفریله و غیرفعال می‌شود. در غلظت بالای BCAAs پروتئین فسفاتاز BDP زیرواحد E1α کمپلکس آنزیمی BCKDH را دفسفریله و آن را فعال می‌کند.

ژنتیک مولکولی کمپلکس آنزیمی آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار: اولین چشم مرتبط با بیماری ادرار شربت افرا در سال ۱۹۸۹ توسط Zhang و همکارانش شناسایی شد. کودک مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا دارای چشم هتروزیگوت مرکب در ژن BCKDHA بود (۱۸). در جدول ۱ مشخصات ژنهای درگیر در بیماری ادرار شربت افرا ذکر شده است. بیشترین چشم‌ها در ژنهای BCKDHA یا BCKDHB با ۳۵٪ و ۴۵٪ در افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا اتفاق می‌افتد (۱۹). اگرچه در اکثر منابع از چهار ژن BCKDHA, BCKDHB,

DLD و DBT, BCKDHB کد می‌شوند (۱۲ و ۱۱). زیرواحد E3 همچنین در ساختار کمپلکس پروتئینی پیرووات دهیدروژناز و آلفاکتوگلوکوتارات نقش دارد (۱۳).



شکل ۱. ساختار ماکرومولکول کتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار نشان می‌دهد که یک هسته مکعبی ۲۴ زیرواحدی همراه با چندین رونوشت از E1 و E3 لایه خارجی این کمپلکس آنزیمی را تشکیل می‌دهند. زیرواحدهای بزرگ E1, E2, E3 نشان می‌دهد که دایمر E3 و هتروترامر E1α2β2 به دمین اتصال E2 (قرمز) متصل می‌شود. (C) دیاگرام واکنشهای بیوشیمیایی، ترانس آمیناسیون لوسین توسط BCAT و تشکیل αKIC را نشان می‌دهد: (واکنش اول) دکربوکسیلاسیون آلفاکتواسید. (واکنش دوم) گروه آسیل متصل به تیمین دی فسفات توسط آنزیم E1 به دمین اتصال لیپوئیل آنزیم E2 انتقال می‌یابد. (واکنش سوم) انتقال آسیل به کوآنزیم A توسط آنزیم E2 صورت می‌گیرد.

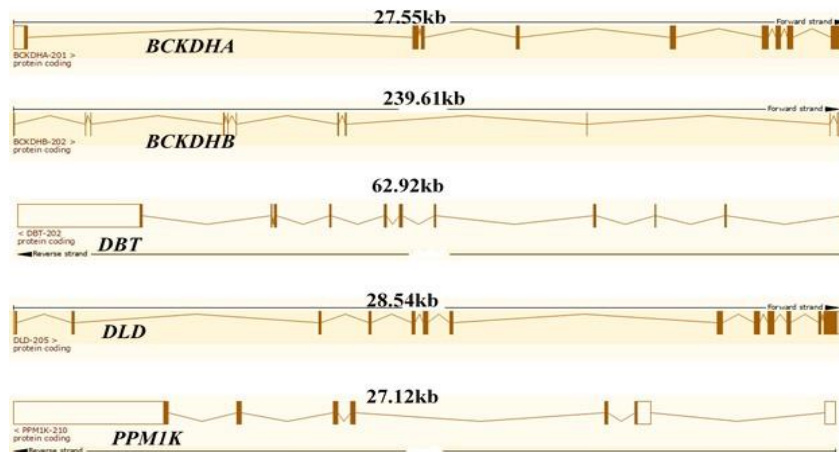
اولین مرحله کاتابولیسم BCAAs، ترانس آمیناسیون اسیدآمینه‌های لوسین، ایزولوسین و والین می‌باشد، در این مرحله تجزیه نرمال BCAAs با انتقال گروه آمین به آلفاکتوگلوکوتارات و تشکیل گلوکوتامات و کتواسیدآمینه‌های شاخه‌دار آنها (BCKAs) آغاز می‌شود. از طریق این ترانس آمیناسیون لوسین به آلفاکتو ایزوکاپروآت، ایزولوسین به آلفاکتوبتا متیل والرات و والین به آلفاکتوایزووالرات تبدیل خواهند شد. در مرحله آغازین، ترانس آمیناسیون BCAAs توسط آنزیم ترانس آمیناز اسیدآمینه شاخه‌دار (BCAT) انجام می‌شود (شکل ۲). مرحله دوم، دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو BCKAs می‌باشد که توسط کمپلکس آنزیمی آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار انجام می‌شود. این مرحله در افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا مختل شده است. مطالعات نشان داده که در افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا اختلال در تجزیه نرمال BCAAs، منجر به اختلال نوروپاتولوژیک و عدم تعادل در نوروترانسمیترها مانند کاهش اسیدآمینه‌های گلوکوتامات، آلانین، گاما آمینوبوتیریک اسید می‌شود (۱۴ و ۱۰).

تنظیم کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار: کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار توسط دو پروتئین تنظیمی BCKDH (BDK, EC 3.1.3.16) و Kinase BCKDH phosphatase (BDP, EC 2.7.11) تنظیم می‌شود. پروتئین فسفاتاز BDP (همچنین PP2CM فسفاتاز نامیده می‌شود) توسط ژن PPM1K کد می‌شود. زمانی که اسیدآمینه‌های شاخه‌دار برای سنتز پروتئین مورد نیاز هستند، پروتئین تنظیمی BDK زیرواحد E1α را در جایگاه‌های خاصی (Ser 302, Ser 292) فسفریله می‌کند. این فسفریلاسیون

فعالیت آنزیمی ۲-۰۰ درصد می‌باشد و بیماری در دوران نوزادی با خوب شیر نخوردن، خواب آلودگی، تشنج و کتواسیدوز همراه است. نوع دوم، فرم حدواسط با افزایش BCAA و BCKA بوده و ۳۰-۳ درصد فعالیت آنزیمی وجود دارد و در هر سنی می‌تواند تظاهر یابد. نوع سوم، یا فرم متناوب که دارای ۲۰-۵ درصد فعالیت آنزیمی می‌باشد، سطح BCAA نرمال بوده، هوش و نمو نرمال مغزی دارند تا زمانی که در وضعیت استرس مانند عفونت قرار بگیرند. نوع چهارم، یا فرم پاسخ دهنده با تیامین که مشابه فرم متناوب یا فرم حدواسط می‌باشد اما به درمان با تیامین پاسخ می‌دهد و منجر به ایجاد سطح نرمال BCAA می‌شود. همچنین دارای ۴۰-۲ درصد فعالیت آنزیمی می‌باشد. ۵. نوع پنجم، کمبود E3 (دی‌هیدرولیپو آمید دهیدروژناز؛ جهش در ژن *DLD*) و فعالیت آنزیمی تقریباً ۲۵-۰ درصد است (۲۸ و ۲۷ و ۱۹). زیرواحد E3 با پیرووات دهیدروژناز و کمپلکس آلفاکتوگلوکوتارات دهیدروژناز مشترک است و کاهش فعالیت E3 منجر به کمبود فعالیت هر سه کمپلکس آنزیمی شده و علائم بالینی متنوعی را نشان می‌دهد. دختری ۱۴ ساله دارای جهش‌های هتروزیگوت مرکب در ژن *DLD* (c.405\_407delAGG) و *Leigh* سندرم (c.1058T>C) را نشان داد (۲۹ و ۱۳). کمبود E3 نادر بوده و منجر به لاکتیک اسیدوز، همچنین افزایش BCAA و BCKA می‌شود (۱۰) و در کمتر از ۲۰ مورد گزارش شده است (۳۰). فرم کلاسیک در ۷۵٪ از افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا در دو هفته اول زندگی تظاهر می‌یابد و در صورت عدم درمان منجر به مرگ می‌شود (۳۲ و ۳۱). در ۲۵٪ از بیماران فرم‌های حدواسط، متناوب و پاسخ دهنده به تیامین با تاخیر در بروز بیماری یا عدم وجود علائم مغزی تظاهر می‌یابند، همچنین دامنه فعالیت آنزیمی BCKD در این حالت ۴۰-۲ درصد می‌باشد (۳۳ و ۳۱ و ۲۷). دامنه فعالیت دکربوکسیلازی کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار در فرم‌های مختلف این بیماری در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۱. مشخصات ژنهای درگیر در بیماری ادرار شربت افرا

ژن	موقعیت سیتوژنتیکی	شماره ترنسکریپت	توالی پپتیدی	اگزون	رفرنس
<i>BCKDHA</i>	19q13.1-13.2	NM_000709.3	AA۴۴۵	۹	(۲۲، ۲۳)
<i>BCKDHB</i>	6q14	NM_000056.4	AA۳۹۲	۱۱	(۲۴ و ۲۵)
<i>DBT</i>	1p21.2	NM_001918.3	AA۴۸۲	۱۱	(۲۵)
<i>DLD</i>	7q31.1	NM_001289751.1	AA۴۸۶	۱۴	(۲۶)
<i>PPMIK</i>	4q22.1	NM_152542.4	AA۳۷۲	۷	(۱۵)



شکل ۴. نمایش اگزونها و اینترونهای مرتبط با ژن‌های درگیر در بیماری ادرار شربت افرا. مناطق توخالی بخشهای غیرکدشونده یک اگزون را نشان می‌دهد. اعداد بیانگر طول ژن‌ها هستند. (منبع پایگاه اطلاعاتی Ensembl، شماره رونوشت‌های نمایش داده شده با شماره رونوشت جدول شماره یک مطابقت دارد).

*DBT*، *DLD* بعنوان ژنهای درگیر در این بیماری ذکر شده است اما اخیراً ژن *PPMIK* بعنوان پنجمین ژن درگیر در بیماری ادرار شربت افرا شناسایی شده (شکل ۴) (۲۰) و با توجه به این موضوع در این مطالعه ویژگی‌های این ژن بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته است. Lu و همکارانش با بررسی روی مدل‌های موشی دریافتند موش‌ها با کمبود *PP2CM* دارای نقص در کاتابولیسم اسیدهای آمینه‌شاخه‌دار و مقادیر بالای BCAAs می‌باشند.

موش‌هایی با نقص در *PP2CM* همراه با رژیم غذایی دارای مقادیر بالای پروتئین، خواب آلودگی، افزایش استرس اکسیداتیو را نشان دادند. این موش‌ها همچنین فنوتیپ مشابه با فرم حدواسط و متناوب بیماری ادرار شربت افرا در انسان نشان می‌دهند. مطالعات آنها نشان داد نقص در *PP2CM* ممکن است فرم ملایم این بیماری را در انسان ایجاد کند (۲۱)؛ *Oyazabal* و همکارانش در دختری مبتلا به فرم ملایم بیماری ادرار شربت افرا (MSUDMV; 615135) جهش هموزیگوت (c.417\_418delTA) را در ژن *PPMIK* گزارش نمودند (۲۰). مطالعات آنها نشان داد اختلال در عملکرد کمپلکس *BCKDH* به دلیل نقص در ژن کدکننده *BCKDH* فسفاتاز (*PPMIK*) بوده و منجر به افزایش قابل توجه غلظت *BCKA* و *BCAA* پلاسما گردیده که با فرم ملایم بیماری ادرار شربت افرا مرتبط است. پدر برای این جهش حذفی هتروزیگوت بود ولی این جهش در مادر وجود نداشت. بررسی‌ها نشان داد دختر مبتلا این جهش حذفی را از طریق دی‌زومی تک‌والدی از پدرش به ارث برده است. تاکنون جهش دیگری که منجر به بیماری شود در این ژن گزارش نشده است (۲۰).

**تظاهرات بالینی بیماری ادرار شربت افرا:** بیماری ادرار شربت افرا یک بیماری هتروژنیک با شدت تظاهر بالینی متغیر است (۲۴ و ۱۷). این بیماری بر اساس فعالیت آنزیمی کمپلکس آلفاکتواسید دهیدروژناز شاخه‌دار به ۵ نوع تقسیم می‌شود. نوع اول، فرم کلاسیک بیماری است که شدیدترین فرم بیماری می‌باشد، همچنین میزان

جدول ۲. دامنه فعالیت دکربوکسیلازی کمپلکس BCKD آنفالتواسید دهیدروناز شاخه‌دار

فعالیت دکربوکسیلازی	زیر واحد کمپلکس BCKD	ژن	سن بروز بیماری	انواع تظاهرات بالینی بیماری ادرار شربت افرا
۰-۲	E1 $\alpha$ ; E1 $\beta$ ; E2	BCKDHA, BCKDHB, DBT	Neonatal	Classic
۳-۳۰	E1 $\alpha$ ; E1 $\beta$ ; E2	BCKDHA, BCKDHB, DBT	Variable	Intermediate
۵-۲۰	E1 $\alpha$ ; E1 $\beta$ ; E2	BCKDHA, BCKDHB, DBT	Variable	Intermittent
۲-۴۰	E2	DBT	Variable	Thiamine-responsive
۰-۲۵	E3	DLD	Variable	E3-deficient

عصبی بعد از تزریق مزمن BCAAs شد، همچنین تیمار با آنتی اکسیدان‌ها مانع از کاهش NGF و افزایش سطوح mRNA آن شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که BCAAs احتمالاً در تنظیم NGF هیپوکامپوس موش‌های در حال رشد و بالغ دخیل است. یافته‌های حاضر نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو می‌تواند به عنوان یک مکانیسم پاتوفیزیولوژیک مهم در آسیب مغزی مشاهده شده در بیماری ادرار شربت افرا مورد توجه قرار گیرد (۴۳).

**نقش سیتواسکت در نوروپاتولوژی افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا:** مکانیسم‌های دقیق مرتبط با آسیب‌های عصبی در بیماری ادرار شربت افرا هنوز به خوبی شناخته نشده و نیازمند مطالعات بیشتری می‌باشد اما مطالعات مدل حیوانی نشان داده که تغییرات سیتواسکت ناشی از تجمع BCKAs با اختلالات مغزی در افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا مرتبط است (۴۴). سیتواسکت سلول‌های یوکاریوتی شبکه پروتئینی است که اساساً از پروتئین‌های فیلامنت‌های حدواسط، میکروفیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها تشکیل شده است. فیلامنت‌های حدواسط به ۵ نوع تقسیم می‌شوند. نوع ۱ و نوع ۲ مربوط به کراتین می‌باشد. فیلامنت‌های نوع ۳ شامل ویمنتین، دسمین، پریفرین، glial fibrillary acidic protein (GFAP)، فیلامنت‌های اصلی در آستروسیت بالغ می‌باشند. فیلامنت‌های نوع ۴ پروتئین‌های نستین، آلفا اینترنکسین و نوروفیلامنت‌ها می‌باشد (۴۵ و ۴۶). نوروفیلامنت‌ها هتروپلی‌مر متشکل از ۳ زیرواحد (NF-L)، (MF-M) و (NF-H) هستند (۴۶). سازماندهی سیتواسکت در سلول‌های یوکاریوتی بستگی به سطح فسفریلاسیون پروتئین‌های آن و همچنین پروتئین‌های تنظیمی ارتباط دارد، بنابراین تغییر در پروتئین‌های فسفریله کننده منجر به ناهنجاری‌های عصبی می‌شود (۴۴). Pessoa-Pureur و همکاران با مطالعه در موش نشان دادند که تجمع ۲ متابولیت KIC و KMV تغییرات قابل توجهی را در زیرواحد NF-H ایجاد می‌کنند؛ همچنین سطح فسفریلاسیون NF-H توسط KIC, KIV, و KMV افزایش می‌یابد (۴۷). BCKA در کورتکس موش فسفریلاسیون فیلامنت‌های حدواسط را تغییر می‌دهد (۴۸)؛ همچنین مطالعه روی مدل‌های حیوانی نشان داده که تجمع BCKAs در بیماری ادرار شربت افرا منجر به تغییرات سیستم فسفریلاسیون مرتبط با فیلامنت‌های حدواسط می‌شود و در نتیجه منجر به اختلال در سازماندهی سیتواسکت، تغییرات مورفولوژیکی و مرگ سلول‌های عصبی می‌گردد (۴۸ و ۴۹). سلول‌های تیمار شده با BCKA پلیمریزاسیون GFAP فسفریله شده را در زیرواحد سرین افزایش می‌دهد، بنابراین هاپرفسفریلاسیون GFAP و اختلال ساختار سلولی می‌تواند در آسیب مغزی مشخص شده در افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا دخیل باشد (۴۵). BCKAs باعث فسفریلاسیون/دفسفریلاسیون نامناسب شده و نهایتاً منجر به اختلال ساختاری و عملکردی سلول‌های عصبی می‌گردند (۴۵ و ۴۴).

**استرس اکسیداتیو و آسیب عصبی در بیماری ادرار شربت افرا:** مطالعات روی انسان و مدل‌های حیوانی نشان داده که اختلال در متابولیسم انرژی می‌تواند منجر به مهار زنجیره انتقال الکترون، آپوپتوز سلول‌های عصبی، اختلال در سنتز نوروترانسمیترها و نوروتوکسیسیتی در افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا شود. در سال‌های اخیر اهمیت استرس اکسیداتیو در ایجاد پاتوفیزیولوژی آسیب‌های مغزی در افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا مورد توجه قرار گرفته است (۳۴). رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال‌های فعال اکسیژن در هر دو شرایط فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک تولید می‌شوند (۳۵). در شرایط فیزیولوژیک تولید رادیکال‌های آزاد برای عملکرد سلول‌های نرمال ضروری بوده و سلول‌ها به طور مداوم رادیکال‌های آزاد تولید می‌کنند اما وقتی غلظت آنها بسیار زیاد شود به DNA، لیپید و پروتئین‌ها آسیب می‌زند. سلول‌ها برای کنترل اکسیدان‌ها دارای سیستم دفاعی آنتی اکسیدان هستند (۳۶ و ۳۵). عدم تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد منجر به پیامدهای پاتولوژیک نظیر استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۷).

لوسین آنزیم آنتی اکسیدان را مهار می‌کند و منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود (۳۵). آسیب‌های ایجاد شده توسط رادیکال‌های آزاد در تعداد زیادی از بیماری‌های انسانی از جمله بیماری‌های عصبی مشاهده شده است؛ همچنین استرس اکسیداتیو در برخی از بیماری‌های متابولیک مادرزادی رخ می‌دهد (۳۸ و ۳۷). MSUD بیماری عصبی است که در آن تجمع متابولیت‌ها منجر به تولید بالای رادیکال‌های فعال و کاهش آنتی اکسیدان‌ها می‌شود (۳۵).

مکانیسم دقیق آسیب مغزی در بیماری ادرار شربت افرا هنوز به خوبی شناخته نشده است. اما این به اثبات رسیده است که غلظت بالای لوسین و KIC با ظهور علائم عصبی همراه بوده و به نظر می‌رسد این ترکیبات متابولیت‌های نوروتوکسیک اصلی در این بیماری باشند (۳۵). لوسین و KIC از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد منجر به آسیب DNA می‌شوند (۳۷)؛ همچنین زمانی که مغز در معرض غلظت بالایی از BCAAs و متابولیت‌ها قرار می‌گیرد آپوپتوز را در سلول‌های عصبی القا می‌کند (۳۹ و ۴۰). افزایش اثر توکسیک متابولیت‌ها در سلول‌های فیبروبلاست افراد مبتلا به بیماری ادرار شربت افرا نشان داد که سلول‌های این بیماران به آپوپتوز مستعد هستند، این موضوع می‌تواند به دلیل فقدان آنزیم آلفالتواسید دهیدروناز شاخه‌دار بوده و این سلول‌ها قادر به متابولیسم BCKAs نمی‌باشند (۴۱). فاکتور رشد عصبی NGF عضو خانواده پروتئین‌های نوروتروپین بوده که در مغز تولید شده و برای رشد، بلوغ و حفظ نورون‌ها ضروری است. این فاکتور رشد در مسیرهای مختلف سیگنالینگ سلولی دخیل در تکامل عصب، رشد آکسون‌ها و انتقال عصبی نقش دارد (۴۳ و ۴۲). Scaini و همکارانش که میزان فاکتور رشد عصبی را در هیپوکامپوس موش بعد از تزریق زیر جلدی BCAAs بررسی کردند، رادیکال‌های آزاد ایجاد شده منجر به کاهش سطوح فاکتور رشد

## مواد و روش‌ها

جهت بررسی سیستماتیک جهش‌ها، مقالات انگلیسی و فارسی به ترتیب در پایگاه داده‌های PubMed و magiran استفاده شد. برای جمع‌آوری این جهش‌ها از "Advance search" در سامانه PubMed استفاده شد و واژه "MSUD" در بخش (Title/Abstract) و واژه "Iran" در بخش (Affiliation) تایپ شد. همچنین جهت بررسی مقالات فارسی زبان، بانک اطلاعات نشریات کشور (<http://www.magiran.com>) مورد استفاده قرار گرفت؛ برای این منظور واژه "MSUD" در بخش جستجو به فارسی و انگلیسی تایپ شد.

## یافته‌ها

تا تاریخ ۹۷/۹/۱۵، در مجموع ۲۰ مقاله فارسی (magiran) و انگلیسی (PubMed) جمع‌آوری شد که از بین آنها ۶ مقاله مرتبط با هدف این مطالعه مروری انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. با بررسی این مقالات تعداد ۲۴ جهش

مرتبط با بیماری ادرار شربت افرا در جمعیت ایران جمع‌آوری شد که از این میان ۱۸ جهش تاکنون در سایر نقاط دنیا گزارش نشده است (جدول ۳). همچنین مشخص شد فراوانی این بیماری در استان‌های کشور بدلیل میزان بالای ازدواج‌های خویشاوندی بالاتر از میانگین جهانی است (شکل ۵).

نرخ شیوع بیماری ادرار شربت افرا: فراوانی بیماری ادرار شربت افرا در کل جهان حدود ۱:۱۸۵۰۰۰-۱:۹۴۰۰۰۰ تولد زنده تخمین زده شده که در برخی از گروه‌های نژادی خاص مانند مونونیتی پنسیلوانیا بیشتر است (۱:۱۷۶) (۵۳). با توجه به میزان ازدواج خویشاوندی در ایران (۳۸/۶ درصد) (۵۴) که بالاتر از آمارهای جهانی است، این بیماری با توارث اتوزومی مغلوب شیوع بیشتری دارد. نرخ شیوع بیماری ادرار شربت افرا گزارش شده در استان‌های مازندران، تهران و فارس در شکل ۵ نشان داده شده است (۵۵-۵۸). نرخ شیوع این بیماری در مورد سایر استان‌های کشور تاکنون گزارش نشده است. لازم به ذکر است که در استان اصفهان در بازه زمانی ۹ ساله در میان ۳۹۲ فرد مبتلا به بیماری متابولیک ۱۸ مورد (۴/۶ درصد) بیمار مبتلا به ادرار شربت افرا گزارش شده است اما شیوع بیماری ذکر نشده است (افراد مبتلا به تعداد موالید) (۵۹).

جدول ۳. جهش‌های گزارش شده بیماری ادرار شربت افرا در ایران

ژن	جهش در سطح نوکلئوتید	جهش در سطح پروتئین	رفرنس
<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3: c.117delC	p.Arg40GlyfsX23	(۴۹)
<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3: c.143delT <sup>†</sup>	p.Leu48ArgfsX14	(۲۲ و ۴۹)
<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3: c.288 + 1G > A <sup>†</sup>	-	(۲۲)
<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3: c.[(375 +1_376-1)_ (884 +1_885-1)del] <sup>†</sup>	-	(۲۲)
<i>BCKDHA</i>	c.452C > T*	p.Thr151Met	(۵۰)
<i>BCKDHA</i>	c.629C > T* <sup>†</sup>	p.Ala210Val	(۵۱)
<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3: c.702delT <sup>†</sup>	p.Tyr235ThrfsX94	(۲۲)
<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3: c.731G > A <sup>†</sup>	p.Gly244Glu	(۲۲)
<i>BCKDHA</i>	c.868G > A*	p.Gly290Arg	(۵۱)
<i>BCKDHA</i>	c.890G > A*	p.Arg297His	(۵۱)
<i>BCKDHA</i>	c.938C > A* <sup>†</sup>	p.Ala313Asp	(۵۰)
<i>BCKDHA</i>	NM_000709.3: c.1167 + 1G > T <sup>†</sup>	-	(۲۲)
<i>BCKDHA</i>	c.1198delA* <sup>†</sup>	p.Lys400fsX13	(۵۱)
<i>BCKDHA</i>	c.1267_1267delC* <sup>†</sup>	p.Gln423fs	(۵۰)
<i>BCKDHB</i>	NM_183050.2: c.[(274 +1_275-1)_ (343 +1_344-1)del] <sup>†</sup>	-	(۲۴)
<i>BCKDHB</i>	c.410C > T*	p.Ala137Val	(۵۱)
<i>BCKDHB</i>	c.496A > G* <sup>†</sup>	p.Lys166Glu	(۵۰)
<i>BCKDHB</i>	NM_183050.2: c.508G > T <sup>†</sup>	p.Arg170Cys	(۲۴)
<i>BCKDHB</i>	NM_000056.4: c.508C > T	p.Arg170Cys	(۵۰ و ۵۲)
<i>BCKDHB</i>	NM_183050.2: c.633 + 1G > A <sup>†</sup>	-	(۲۴)
<i>BCKDHB</i>	c.652C > T* <sup>†</sup>	p.Pro218Ser	(۵۱)
<i>BCKDHB</i>	NM_183050.2: c.833_834insCAC <sup>†</sup>	p. Gly278_Thr279insThr	(۲۴)
<i>BCKDHB</i>	NM_183050.2: c.988G > A <sup>†</sup>	p.Glu330Iys	(۲۴ و ۵۰)
<i>DBT</i>	c.1150A > G* <sup>†</sup>	p.Ser384Gly	(۵۱)

\* شماره رونوشت در مقاله اصلی ذکر نشده است. † جهش‌هایی که فقط در ایران گزارش شده‌اند.



شکل ۵. نرخ شیوع گزارش شده در استان‌های مازندران، تهران و فارس

### بحث و نتیجه‌گیری

تعداد زیادی از این جهش‌ها (۱۸ عدد از ۲۴ جهش) فقط در ایران شناسایی شده و تاکنون در سایر نقاط جهان گزارش نشده است. از آنجایی که تشخیص زودرس بیماری ادرار شربت افرا قبل از ایجاد علائم عصبی در پیشگیری این بیماری در نوزادان اهمیت زیادی دارد. بنابراین شناسایی و جمع‌آوری جهش‌های ژنتیکی دخیل در این بیماری در جمعیت ایران می‌تواند در انجام آزمایشات تشخیصی پره ناتال برای خانواده‌ها با سابقه خانوادگی ابتلا به این بیماری مفید بوده و تشخیص و درمان به موقع را تسهیل نماید. جهش‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق می‌تواند مورد استفاده آزمایشگاه‌های ژنتیک پزشکی کشور قرار گیرد.

بیماری ادرار شربت افرا، یک اختلال هتروژنیک با تظاهرات بالینی متغیر است که به علت جهش در ژنهای کدکننده کمپلکس آلفاگتوساید دهیدروژناز به وجود می‌آید. فراوانی بیماری ادرار شربت افرا در کل جهان ۱:۱۸۵۰۰۰ است و با توجه به میزان بالای ازدواج خویشاوندی در ایران نسبت به آمار جهانی، شیوع بیشتر این بیماری مورد انتظار است. براساس پایگاه اطلاعاتی جهش‌های انسانی (HGMD) تاکنون بیش از ۲۰۰ جهش در ژنهای دخیل در این بیماری شناسایی شده است. در این بررسی جهش‌های گزارش شده در جمعیت ایران جمع‌آوری گردیده است که

# The Genes Responsible for Maple Syrup Urine Disease, Molecular Pathomechanisms and Causative Mutations in Iranian Population

N. Gorjizadeh (BSc)<sup>1</sup>, O. Jazayeri (PhD)<sup>\*2</sup>, S. Najavand (PhD)<sup>1</sup>, M. Alijanpour (MD)<sup>3</sup>

1.Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R.Iran

2.Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, I.R.Iran

3.Non-Communicable Pediatric Disease Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Science, Babol, I.R.Iran

---

J Babol Univ Med Sci; 20(12); Dec 2018; PP: 39-48

Received: June 5<sup>th</sup> 2018, Revised: Aug 3<sup>rd</sup> 2018, Accepted: Dec 18<sup>th</sup> 2018.

## ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Maple syrup urine disease is a rare inborn metabolic inherited disorder caused by deficiency of branched chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex and leading to accumulation of branched chain amino acids in body fluid. The incidence of MSUD is higher in populations with high consanguineous marriage. BCKD is a mitochondrial complex which is encoded by four nuclear genes (*BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT*, and *DLD*) and MSUD can be caused by mutation within any of these four genes. Accumulation of metabolic is associated with impairment of energy metabolism, provoke apoptosis, dysfunctional neurotransmitter synthesis and neuropathological defects such as seizure, psychomotor delay and coma. In the present study, we investigated the incidence of MSUD in Iran, compiled previously reported mutations in Iranian population and also explained molecular pathomechanisms underlying MSUD.

**METHODS:** To compile MSUD mutations, we systematically reviewed PubMed and magiran databases to find related articles in English and Persian language, respectively. The key words "MSUD" and "Iran" was used as query.

**FINDINGS:** Until 9<sup>th</sup> December 2018, twenty four MSUD mutations were collected from Iranian population of which 18 mutations have been only identified in Iran and were not reported in other populations yet. Likewise, because of high consanguineous marriages, the incidence of MSUD were higher than worldwide average in different provinces.

**CONCLUSION:** Identification and compiling of MSUD mutations in Iranian population can be useful for prenatal genetic diagnosis in at risk families and play crucial role in early diagnosis and also treatment before starting neurological symptoms in newborns.

**KEY WORDS:** *Maple syrup urine disease, BCKDHA, BCKDHB, DBT, DLD, PPM1K.*

---

### Please cite this article as follows:

Gorjizadeh N, Jazayeri O, Najavand S, Alijanpour M. The Genes Responsible for Maple Syrup Urine Disease, Molecular Pathomechanisms and Causative Mutations in Iranian Population. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(12): 39-48.

---

\*Corresponding Author: O. Jazayeri (PhD)

Address: Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Science, University of Mazandaran, Babolsar, I.R.Iran

Tel: +98 11 35302457

E-mail: o.jazayeri@umz.ac.ir

## References

1. Su L, Lu Z, Li F, Shao Y, Sheng H, Cai Y, et al. Two homozygous mutations in the exon 5 of BCKDHB gene that may cause the classic form of maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* 2017;32(3):765-72.
2. Kathait AS, Puac P, Castillo M. Imaging findings in maple syrup urine disease: A case report. *J Pediatr Neurosci* 2018;13(1):103-5.
3. Menkes JH, Hurst PL, Craig JM. A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics.* 1954;14(5):462-7.
4. Nellis MM, Kasinski A, Carlson M, Allen R, Schaefer AM, Schwartz EM, et al. Relationship of causative genetic mutations in maple syrup urine disease with their clinical expression. *Mol Genet Metab.* 2003;80(1):189-95.
5. Hou JW. Maple syrup urine disease complicated with kyphoscoliosis and myelopathy. *Pediatr Neonatol* 2016;57(5):431-5.
6. Quental S, Macedo-Ribeiro S, Matos R, Vilarinho L, Martins E, Teles EL, et al. Molecular and structural analyses of maple syrup urine disease and identification of a founder mutation in a Portuguese Gypsy community. *Mol Genet Metab* 2008;94(2):148-56.
7. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH. Mechanisms responsible for regulation of branched-chain amino acid catabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(2):391-6.
8. Bremer S, Blikrud YT, Rootwelt H, Woldseth B, Tangeraaas T, Sæves I, et al. Identification of a novel BCKDHA deletion causing maple syrup urine disease. *Meta Gene.* 2016;10:86-9.
9. Wang YP, Qi ML, Li TT, Zhao YJ. Two novel mutations in the BCKDHB gene (R170H, Q346R) cause the classic form of maple syrup urine disease (MSUD). *Gene.* 2012;498(1):112-5.
10. Zinnanti WJ, Lazovic J. Interrupting the mechanisms of brain injury in a model of maple syrup urine disease encephalopathy. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(1):71-9.
11. Chuang DT, Chuang JL, Wynn RM. Lessons from genetic disorders of branched-chain amino acid metabolism. *J Nutr* 2006;136(1):243S-9S.
12. Liu G, Ma D, Hu P, Wang W, Luo C, Wang Y, et al. A novel whole gene deletion of BCKDHB by Alu-mediated non-allelic recombination in a Chinese patient with maple syrup urine disease. *Front Genet.* 2018;9:145.
13. Henneke M, Flaschker N, Helbling C, Müller M, Schadewaldt P, Gärtner J, et al. Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat.* 2003;22(5):417-.
14. Sperringer JE, Addington A, Hutson SM. Branched-chain amino acids and brain metabolism. *Neurochem Res.* 2017;42(6):1697-709.
15. Wynn RM, Li J, Brautigam CA, Chuang JL, Chuang DT. Structural and biochemical characterization of human mitochondrial branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase phosphatase. *J Biol Chem.* 2012;287(12):9178-92.
16. Burrage LC, Nagamani SC, Campeau PM, Lee BH. Branched-chain amino acid metabolism: from rare Mendelian diseases to more common disorders. *Hum Mol Genet* 2014;23(R1):R1-R8.
17. Skvorak K. Animal models of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis* 2009;32(2):229-46.
18. Zhang B, Kuntz MJ, Goodwin GW, Edenberg HJ, Crabb DW, Harris RA. cDNA cloning of the e1 $\alpha$  subunit of the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase and elucidation of a molecular basis for maple syrup urine disease. *Ann N Y Acad Sci* 1989;573(1):130-6.
19. Kliegman R, Behrman RE, Nelson WE. Nelson textbook of pediatrics, 20th ed. Canada: Elsevier; 2016. p.649-52.
20. Oyarzabal A, Martínez-Pardo M, Merinero B, Navarrete R, Desviat LR, Ugarte M, et al. A novel regulatory defect in the branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex due to a mutation in the ppm1k gene causes a mild variant phenotype of maple syrup urine disease. *Hum Mutat.* 2013;34(2):355-62.
21. Lu G, Sun H, She P, Youn JY, Warburton S, Ping P, et al. Protein phosphatase 2Cm is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1678-87.
22. Abiri M, Karamzadeh R, Karimipoor M, Ghadami S, Alaei MR, Bagheri SD, et al. Identification of six novel mutations in Iranian patients with maple syrup urine disease and their in silico analysis. *Mutat Res* 2016;786:34-40.



23. Zhang B, Crabb DW, Harris RA. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the E1 $\alpha$  subunit of human liver branched-chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase. *Gene*. 1988;69(1):159-64.
24. Abiri M, Karamzadeh R, Mojibafan M, Alaei MR, Jodaki A, Safi M, et al. In silico analysis of novel mutations in maple syrup urine disease patients from Iran. *Metab Brain Dis*. 2017;32(1):105-13.
25. Zneimer SM, Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Chuang JL, Chuang DT, et al. Regional assignment of two genes of the human branched-chain  $\alpha$ -keto acid dehydrogenase complex: the E1 $\beta$  gene (BCKDHB) to chromosome 6p21–22 and the E2 gene (DBT) to chromosome 1p31. *Genomics* 1991;10(3):740-7.
26. Pons G, Raefsky-Estrin C, Carothers DJ, Pepin RA, Javed AA, Jesse BW, et al. Cloning and cDNA sequence of the dihydrolipoamide dehydrogenase component human alpha-ketoacid dehydrogenase complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(5):1422-6.
27. Mitsubuchi H, Owada M, Endo F. Markers associated with inborn errors of metabolism of branched-chain amino acids and their relevance to upper levels of intake in healthy people: an implication from clinical and molecular investigations on maple syrup urine disease. *J Nutr*. 2005;135(6):1565S-70S.
28. Guo Y, Liming L, Jiang L. Two novel compound heterozygous mutations in the BCKDHB gene that cause the intermittent form of maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2015;30(6):1395-400.
29. Quinonez SC, Leber SM, Martin DM, Thoene JG, Bedoyan JK. Leigh syndrome in a girl with a novel DLD mutation causing E3 deficiency. *Pediatr Neurol* 2013;48(1):67-72.
30. Harris-Haman P, Brown L, Massey S, Ramamoorthy S. Implications of Maple Syrup Urine Disease in Newborns. *Nurs Womens Health* 2017;21(3):196-206.
31. Flaschker N, Feyen O, Fend S, Simon E, Schadewaldt P, Wendel U. Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease. *J Inher Metab Dis*. 2007;30(6):903-9.
32. Li W, Meng X, Wang W, Jinfeng LV, Yingmei Sun, Yanan LV, et al. Silico analysis of a novel mutation c. 550delT in a Chinese patient with maple syrup urine disease. *Clin Case Rep*. 2018;6(10):1989-93.
33. Blackburn PR, Gass JM, Vairo FPE, Farnham KM, Atwal HK, Macklin S, et al. Maple syrup urine disease: mechanisms and management. *Appl Clin Genet*. 2017;10:57.
34. Zubarioglu T, Kiykim E, Cansever MS, Neselioglu S, Aktuglu-Zeybek C, Erel O. Evaluation of dynamic thiol/disulphide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in maple syrup urine disease patients under treatment. *Metab Brain Dis*. 2017;32(1):179-84.
35. Sitta A, Ribas GS, Mescka CP, Barschak AG, Wajner M, Vargas CR. Neurological damage in MSUD: the role of oxidative stress. *Cell Mol Neurobiol*. 2014;34(2):157-65.
36. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007;18(9):567-79.
37. Mescka CP, Wayhs CAY, Guerreiro G, Manfredini V4, Dutra-Filho CS5, Vargas CR. Prevention of DNA damage by L-carnitine induced by metabolites accumulated in maple syrup urine disease in human peripheral leukocytes in vitro. *Gene* 2014;548(2):294-8.
38. Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, et al. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis* 2011;26(1):21-8.
39. Jouvett P, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, et al. Branched Chain Amino Acids Induce Apoptosis in Neural Cells without Mitochondrial Membrane Depolarization or Cytochrome c Release: Implications for Neurological Impairment Associated with Maple Syrup Urine Disease. *Mol Biol Cell*. 2000;11(5):1919-32.
40. Vilela TC, Scaini G, Furlanetto CB, Pasquali MA, Santos JP, Gelain DP, et al. Apoptotic signaling pathways induced by acute administration of branched-chain amino acids in an animal model of maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis*. 2017;32(1):115-22.

41. Jouvét P, Kozma M, Mehmet H. Primary human fibroblasts from a maple syrup urine disease patient undergo apoptosis following exposure to physiological concentrations of branched chain amino acids. *Ann N Y Acad Sci* 2000;926(1):116-21.
42. Sofroniew MV, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 2001;24(1):1217-81.
43. Scaini G, Mello-Santos LM, Furlanetto CB, Jeremias IC, Mina F, Schuck PF, et al. Acute and chronic administration of the branched-chain amino acids decreases nerve growth factor in rat hippocampus. *Mol Neurobiol*. 2013;48(3):581-9.
44. Pessoa-Pureur R, Wajner M. Cytoskeleton as a potential target in the neuropathology of maple syrup urine disease: insight from animal studies. *J Inherit Metab Dis* 2007;30(5):664-72.
45. Funchal C, dos Santos AQ, Jacques-Silva MC, Zamoner A, Gottfried C, Wajner M, et al. Branched-chain  $\alpha$ -keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. *Metab Brain Dis*. 2005;20(3):205-17.
46. Nixon RA. The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol*. 1993;3(1):29-38.
47. Pessoa-Pureur R, Funchal C, de Lima Pelaez P, Vivian L, Oliveira Loureiro S, de Freitas Miranda R, et al. Effect of the branched-chain  $\alpha$ -ketoacids accumulating in maple syrup urine disease on the high molecular weight neurofilament subunit (NF-H) in rat cerebral cortex. *Metab Brain Dis*. 2002;17(2):65-75.
48. Funchal C, Gottfried C, Vieira De Almeida LM, Wajner M, Pessoa-Pureur R. Evidence that the branched-chain  $\alpha$ -keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce morphological alterations and death in cultured astrocytes from rat cerebral cortex. *Glia*. 2004;48(3):230-40.
49. Mirzaee A, Pishva N, Karamizadeh Z, Kohlhase J, Purarian Sh, Hemmati F, et al. A classic case of maple syrup urine disease and a novel mutation in the BCKDHA gene. *Iran J Neonatol*. 2017; 8(3):72-4.
50. Sedaghat A, Zamani M, Jahanshahi A, Ghaderian SB, Shariati Gh, Alihossein Saberi, et al. Frequent novel mutations are causative for maple syrup urine disease from Southwest Iran. *Meta Gene*. 2018;16:96-104.
51. Zeynalzadeh M, Tafazoli A, Aarabi A, Moghaddassian M, Ashrafzadeh F, Houshmand M, et al. Four novel mutations of the BCKDHA, BCKDHB and DBT genes in Iranian patients with maple syrup urine disease. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2018;31(2):205-212.
52. Miryounesi M, Ghafouri-Fard S, Goodarzi H, Fardaei M. A new missense mutation in the BCKDHB gene causes the classic form of maple syrup urine disease (MSUD). *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;28(5-6):673-5.
53. Puckett R, Lorey F, Rinaldo P, Lipson MH, Matern D, Sowa ME, et al. Maple syrup urine disease: further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms. *Mol Genet Metab*. 2010;100(2):136-42.
54. Saadat M, Ansari-Lari M, Farhud D. Short report consanguineous marriage in Iran. *Ann Hum Biol*. 2004;31(2):263-9.
55. Zahed Pasha Y, Ahmadpour-Kacho M, Alijanpour M, Behmadi R, Jahangir T. Prevalence of maple syrup urine disease in amirkola children's hospital, iran (2002-2012). *J Babol Univ Med Sci*. 2014;16(3):54-8. [In Persian]
56. Alijanpour Aghamaleki M, Esmaeili Dooki M, Zahed Pasha Y, Moslemi L. The Frequency of Hereditary Metabolic Diseases in Children Referred to Amirkola Children Hospital (2005-2015). *J Babol Univ Med Sci*. 2016;18(10):60-4. [In Persian]
57. Najafian B, Shahverdi E, Konjedi MA, Tohidi M. Maple syrup urine disease: incidence and related factors in infants 2008-2015, Tehran, Iran. *Galen Metab J*. 2015;4(4):164-68.
58. Golbahar J, Karamizadeh Z, Honardar Z. Selective screening of amino acid disorders in the south-west of Iran, Shiraz. *J Inherit Metab Dis*. 2002;25(6):519-21.
59. Najafi R, Hashemipour M, Yaghini O, Najafi F, Rashidianfar A. Demographic and clinical characteristics of the children with aminoacidopathy in Isfahan Province, Central Iran in 2007-2015. *Indian J Endocrinol Metab*. 2016;20(5):679-83.