زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره ۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

بررسی احتمال حضور جهش‌ها در اگزون‌های ۸، ۹ و ۳۰ ژن MYH7در بیماری HCM در استان چهارمحال و بختیاری

طیبه ربانی نیا[۱]، راضیه پوراحمد[۲*]، ارسلان خالدی فرر[۳]، مرتضی‌هاشم زاده[۴]، شهربانو پرچمی[۴]

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد
۲- دانشیار ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد
۳- دانشیار قلب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
٤- استاد ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
۵- کارشناس، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

* شهرکرد، صندوق پستی ۱۱۵
Razieh_Jaktaji@yahoo.com

چکیده-هاایپرتروفی کاردیومیوپاتی (HCM) یک بیماری قلبی نادر است که می‌تواند منجر به مرگ ناگهانی در افراد جوان شود. مطالعات مولکولی بیماری نشان داد که جهش در ژن زنجیره سنگین میوزین بتا (*MYH7*) یکی از مهمترین عوامل بروز HCM است. هدف از این تحقیق بررسی اگزون‌های ۸، ۹ و ۳۰ ژن *MYH7* در بیماران HCM استان چهار محال و بختیاری برای جهش‌های احتمالی بود.

در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی DNA به روش فنل-کلروفرم از ۲۷ نمونه خون بیماران استخراج شد. سپس نمونه‌های DNA برای روش PCR-SSCP جهت تکثیر و شناسایی جهش استفاده شد. موارد مشکوک به داشتن جهش احتمالی تعیین توالی گردید و نتایج با نرم‌افزار Chromas مورد مشاهده قرار گرفت.

۷ نمونه با روش PCR_SSCP مشکوک تشخیص داده شد که برای تأیید با پرایمرهای پیشرو و معکوس جهت حضور جهش تعیین توالی گردید. نتایج تعیین توالی حضور جهش را تأیید نکرد.

می‌توان نتیجه‌گیری کرد که جهش در این ۳ اگزون در ایجاد بیماری در افراد بررسی شده نقشی نداشت. با این وجود بررسی تعداد بیشتر افراد مبتلا به HCM و اگزون‌های دیگر این ژن برای بررسی رابطه ژن با بیماری HCM و کسب اطلاعات لازم برای درمان و مدیریت بیماری توصیه می‌شود.

کلیدواژگان: جهش، PCR-SSCP،هایپرتروفی کاردیومیوپاتی، *MYH7*

۱- مقدمه

هایپرتروفی کاردیومیوپاتی[۱] (HCM) یک اختلال ژنتیکی اتوزوم غالب است که با بزرگ شدن بطن چپ مشخص می‌شود؛ فنوتیپ آن از نداشتن علائم تا نوع شدید، تغییر می‌کند و بخشی از میزان مرگ سالانه در حدود ۱ تا ٤٪ را

[۱] Hypertrophic Cardio Myopathy

Archive of SID
www.SID.ir

به خود اختصاص داده است [۱]. همچنین نوع وراثت وابسته به X مغلوب آن در برخی موارد دیده شده است [۲].

شکل اصلی HCM معمولاً ارثی است، اما این بیماری در تقریباً ۵۰٪ موارد خودبخودی و در اثر جهش‌های جدید به وجود می‌آید [۳]. بیماری HCM هتروژنی بالایی در هردو سطح اللی و غیراللی دارد و تاکنون نقش ۱۰ ژن در ایجاد آن شناسایی شده است که پروتئین‌های سارکومری را کد می‌کنند. سارکومرها واحدهای انقباضی سلول هستند و میوزین و اکتین، پروتئین‌های اصلی سازنده آن‌ها می‌باشند [٤]. HCM به وسیله جهش در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های میوفیلامنت سارکومر، پروتئین‌های دیسک Ż[1]، پروتئین‌های حساس به کلسیم، و دیگر پروتئین‌های وابسته به سارکومر ایجاد می‌شود؛ همچنین جهش در دو ژن درگیر در متابولیسم کربوهیدرات در عضله از دیگر عوامل درگیر در این بیماری هستند [۵]، اما فنوتیپ HCM تنها با این ژن‌ها تعیین نمی‌شود؛ ژن‌های تعدیل کننده و فاکتورهای اپی‌ژنتیک نیز در فنوتیپ این بیماری و میزان بروز آن مشارکت دارند که درصد دقیق آن مشخص نیست [٦]. عدم تعادل متابولیسم انرژی ماهیچه قلبی و ناکارآمدی‌هاپلوییدی نیز در این بیماری دخالت دارد [۷]. اگرچه گزارش شده است که متالوپروتئین‌های ماتریکس پلاسمایی در بازآرایی بطن چپ در بیماران HCM نقش دارند، اما تأثیر این متالوپروتئین‌ها در این بیماران تا حدودی مبهم است [۸].

در عضله قلب سلول‌های نرمال قلبی در خط‌های مستقیم و صاف قرار می‌گیرند، اما درهایپرتروفی، سلول‌ها در لایه‌های به‌هم‌ریخته و فاقد سازماندهی مشخص قرار دارند. در سطح بیوفیزیک، جهش‌های میوفیلامنت که جهش‌هایی هستند که در پروتئین‌های میوفیلامنت تشکیل دهنده ساختار سارکومر رخ می‌دهند، حساسیت به کلسیم و فعالیت ATPase را افزایش می‌دهند که بر عملکرد عضله قلب، تأثیر می‌گذارند [۹].

در کودکان و نوجوانان، HCM در بیشتر موارد، با بیماری‌های مادرزادی، اختلالات متابولیک، و بیماری‌های عصبی و عضلانی همراه است [۱۰]. شکل ارثی بیماری، بیشتر در بزرگسالان دیده شده است، تشخیص آن از طریق اکوکاردیوگرافی دوبعدی که وجودهایپرتروفی در بطن چپ را مشخص می‌کند، آزمایش‌های ژنتیکی مانند غربال‌گری به صورت بررسی اختصاصی جهش در ژن-های عامل این بیماری و توالی‌یابی همچنین در نظر گرفتن سابقه بیماری در خانواده است [۱۱]. اگرچه جهش‌های مسئول این بیماری هنگام تولد وجود دارند، اما معمولاً در مراحل اولیه یا حتی در کودکی بروز نمی‌کنند که به دلیل ماهیت اتوزوم غالب این بیماری و بروز متغیر آن است که تحت تأثیر عوامل اپی‌ژنتیک و ژن‌های تعدیل کننده قرار دارد (٦) [۱۲].

بررسی ژن *MYH7* کدکننده‌ی زنجیره‌ی سنگین میوزین بتا نشان داده است که مهم‌ترین ژن عامل بیماری HCM، این ژن است و فراوان‌ترین دلیل ایجادهایپرتروفی ارثی و کاردیومیوپاتی اتساعی (HCM / DCM) می‌باشد [۱۳]؛ جایگاه ژن *MYH7* روی کروموزوم ۱۱-۱۲q۱٤ تشخیص داده شده است. این ژن ٤۰ اگزون دارد و پروتئینی با ۱۹۳۵ اسیدآمینه را کد می‌کند. ؛ بیش از ۱۹۰ جهش در ژن *MYH7* با نفوذ بالینی متفاوت شرح داده شده است، تعدادی جهش با اثرات نسبتاً خوش‌خیم و امید به زندگی و بقیه مرتبط با شیوع بالای مرگ ناگهانی هستند [۱٤]. بیشترین جهش‌ها در اگزون‌های ۳ تا ۲٦ این ژن دیده شده است که کدکننده سر و گردن (محل اتصال سر به دم) پروتئین‌های سارکومری می‌باشند و جهش‌های آن باهایپرتروفی شدید و ریسک بالای مرگ ناگهانی در جوانی مرتبط است [۱۵]. همچنین تعدادی جهش در اگزون‌های ناحیه‌ی دم *MYH7* در بیماران HCM گزارش

[1] Z-disc

Archive of SID
www.SID.ir

شده است؛ گفته‌می‌شود که این ناحیه در تجمع رشته‌های ضخیم، اتصال پروتئین‌های فرعی و ایجاد ساختار مارپیچی حلقوی در پروتئین نقش دارد [۱۸-۱۶]. تا کنون حدود ۲۰۰ جهش برای بیماری HCM شناخته شده است [۱۹] که جهش در ژن سارکومری *MYH7* بیشترین عامل ایجادکننده (حدود ٤٠٪) این بیماری است [۲۰]. از بین جهش‌های شناخته شده در ژن *MYH7*، بیشتر از ۵۰ جهش باعث نفوذ کامل بیماری HCM در ۲۰ سالگی و کاهش قابل توجه در طول عمر می‌شوند(١٤)، در حالی که سایر جهش‌ها تأثیر کمتری دارند [۲۱]. رویارویی با بیماری هتروژنی مانند HCM با تنوع ژنتیکی بالای ژنوم انسان و فراوانی بالای جهش‌های جدید، مشکلات پیش‌بینی نشده زیادی را باعث می‌شود، اما تعیین ژنوتیپ در HCM می‌تواند ابزار قدرتمندی برای بررسی و تشخیص ژنتیکی باشد [۲۲،۲۳].

مطالعات اولیه نشان داد که اگرچه HCM یک بیماری شایع نیست، اما با میزان مرگ سالانه ٤-٪۲ در بزرگسالان و ٦٪ در کودکان و نوجوانان عمدتا به صورت ناگهانی همراه است [۲٦-۲٤]. بسیاری از بیماران HCM طی ورزش کردن یا بعد از آن، در معرض مرگ ناگهانی، قرار دارند. به همین دلیل، این افراد باید از انجام ورزش‌های سنگین و فشرده اجتناب کنند [۲۷].

در مطالعه‌ای که قبلاً در استان چهار محال و بختیاری روی جهش‌های ۹ اگزون این ژن صورت گرفته بود در ۳ نفر جهش‌هایی شناسایی شد که دو نفر در اگزون ۱۹ و یک نفر در اگزون ۲۲ دارای جهش بودند [۲۹،۳۰]. لذا تصمیم گرفته شد ۳ اگزون جهش پذیر دیگر این ژن شامل اگزونهای ۸ و ۹ کد کننده سر و گردن و اگزون ۳۰ کد کننده دم پروتئین سارکومری در استان چهارمحال وبختیاری مطالعه شود تا اطلاعات بیشتری در مورد نقش موتانهای احتمالی ژن *MYH7* در ایجاد بیماری HCM در این استان بدست آید.

۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی که به مدت یک سال به طول انجامید از نمونه‌های خون بیماران (۲۷ نمونه) که در فریزر C ° ۲۰ - در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی نگهداری شده بود و حاصل تحقیق قبلی در این زمینه بود استفاده شد [۲۹،۳۰]. متاسفانه در مدت زمان این تحقیق تعداد نمونه‌ها افزایش نیافت. DNA خون بیماران به روش روتین فنل کلروفرم استخراج گردید و غلظت DNA استخراج شده و میزان خلوص آن با روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. در ادامه با استفاده از توالی ژن*MYH7* با رمز دسترسی (NG_۰۰۷۸۸٤) و نرم افزار GeneRunner 3.0، توالی‌های پرایمر پیشرو (F) و معکوس (R) برای اگزون ۸، ۹ و ۳۰ این ژن از کمی بالاتر از محل اصلی اگزون (درون اینترون) طراحی شد و خریداری گردید (جدول ۱). همچنین برای بالا بردن دقت کار در SSCP پرایمر با جهش ساختگی از انتهای ٤ تا ٦ نوکلئوتیدی در سمت′۳ پیشرو طراحی شد و محصول PCR حاصل از آن به عنوان نمونه کنترل مثبت در SSCP[1] استفاده شد.

جدول ۱ توالی‌های آغازگر و دمای اتصال سه اگزون. F آغازگر پیشرو، R آغازگر معکوس و M آغازگر دارای جهش.

توالی آغازگر	دمای اتصال	اندازه قطعه (bp)	نام اگزون
F: GAGGGAGAAGAGCTCTCAC R: CCTCCACCAGTCCAAGTC M:GAGGGAGAAGAGCTG*TCAC	٥٤	۱۸۱	۸
F:ATGAGCCTTCCCCCAACTC R:GCAAGGGTGAGCTTAGGCTG M: ATGAGCCTTCCCCCG*ACTC	٦٠	۱٥٤	۹
F: GAGAAAGCTGAACCCACC R: GGGCCTCAGCCAGAAGTC M: GAGAAAGCTGAACCT*ACC	٥٦	۲۷٤	۳۰

واکنش برای هر اگزون بصورت اختصاصی و به منظور افزایش قطعه مورد نظر، انجام شد. هر میکروتیوب PCR حاوی ۰/۵ میکرولیتر از هریک از دو آغازگر با غلظت ۱۰

[1] Single Strand Conformational Polymorphism

Archive of SID
www.SID.ir

پیکومولار، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۵ unit/µl)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میکرومولار) و DNA ۱ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) بود که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر FTC ۳/۰۵ ساخت شرکت تکن انجام شد. شرایط دمایی بهینه شامل ۳۵ سیکل مشتمل بر: دمای واسرشته شدن اولیه ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، دمای واسرشته شدن ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال پرایمر طبق جدول ۱ برای هر اگزون متفاوت بود، به مدت ۱ دقیقه و دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. بسط نهایی نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

استفاده از تکنیک چند شکلی ساختار تک رشته‌ای SSCP[1] بر این اساس استوار است که هنگام حرکت DNA تک رشته‌ای قادر است در بخش‌هایی با خود پیوند هیدروژنی تشکیل دهد؛ پس هر رشته بر اساس توالی DNA ساختار ثانویه خاصی خواهد داشت و این ساختار فضایی در میزان حرکت تک رشته‌ای با طول یکسان در ژل مؤثر خواهد بود. بخاطر اختلاف در توالی ودر نتیجه اختلاف در ساختار فضایی در ژل DNA دو قطعه در ژل الکتروفورز از هم تفکیک خواهند شد [۲۸].

به منظور بررسی جهش‌های احتمالی با استفاده از روشPCR-SSCP بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR نمونه‌های مورد نظر روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ٤٥ دقیقه الکتروفورز شدند که این الکتروفورز مربوط به محصول PCR هر نمونه بود. در صورت صحت باندها محصول PCR مربوط به آن‌ها در ادامه جهت روش SSCP مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، ۷ میکرولیتر از هر نمونه‌ی محصول PCR با ۵ میکرولیتر بافر واسرشته کننده مخصوص SSCP مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۹٦ درجه حرارت داده شد تا دو رشته به طور کامل از هم جدا شوند. سپس نمونه‌های DNA بلافاصله روی یخ قرار گرفتند تا از تشکیل مجدد دو رشته ای ممانعت شود. محصولات PCR آماده شده روی ژل پلی اکریل آمید بارگیری شدند (جدول ۲) بعد از پایان الکتروفورز، ژل پلی اکریل آمید با نیترات نقره رنگ آمیزی شدند و باندهای DNA بر روی آن رویت گردید و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در نهایت کلیه‌ی نمونه‌های مشکوک به جهش تعیین توالی شدند و نتایج با استفاده از نرم افزار Chromas تجزیه و تحلیل شدند.

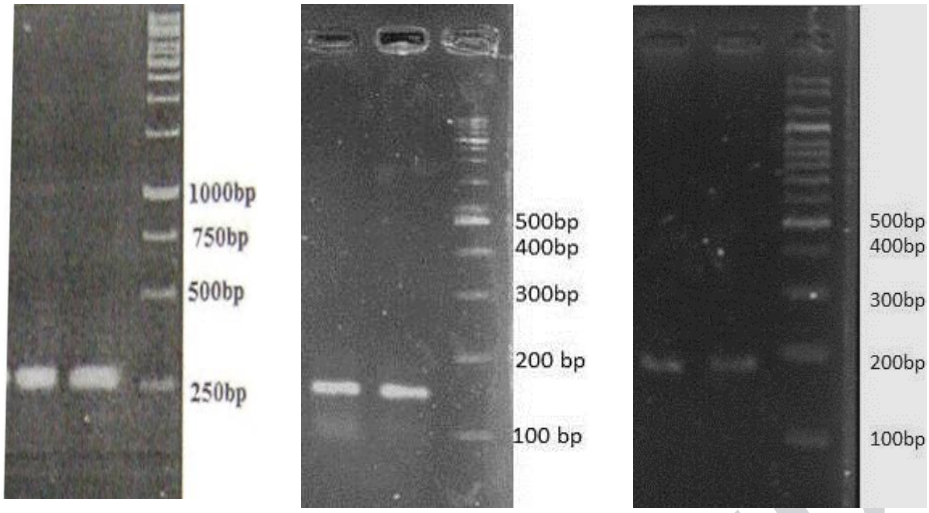
جدول ۲ شرایط تنظیم شده برای SSCP اگزون‌های ژن *MYH7*

نوع اگزون	غلظت ژل	زمان	ولتاژ	دما
اگزون ۸ و ۹	۱۲٪	٦ ساعت	۲۵۰ ولت	۲٤ درجه سانتی‌گراد
اگزون ۳۰	۱۰٪	۸ ساعت	۲۸۰ ولت	۱۸ درجه سانتی‌گراد

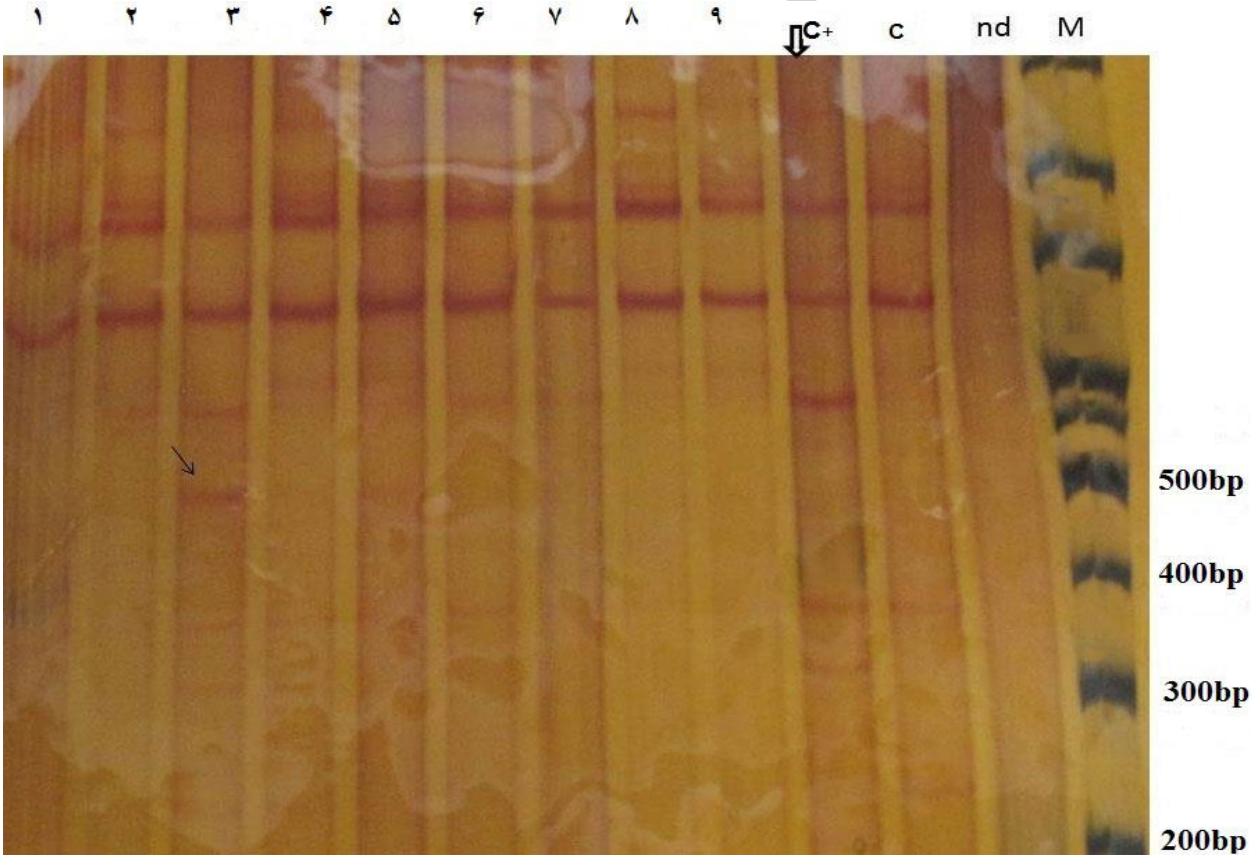
۳- یافته‌ها

از ۲۷ نمونه خون جمع‌آوری شده به روش نمونه‌گیری آسان از مبتلایان به HCM مراجعه کننده به بیمارستان‌هاجر شهرکرد، DNA به روش فنل-کلروفرم استخراج شد. میزان خلوص نمونه‌های DNA با روش اسپکتروفتومتری بین ۲-۱/۸بود. اگزون‌های ۸، ۹ و ۳۰ ژن *MYH7* با روش PCR تکثیر شد. نتایج ژل الکتروفورز آن‌ها در شکل ۱ ارائه شده است. اندازه اگزون‌های ۸ ، ۹ و ۳۰ به ترتیب ۱۸۱ ، ۱٥٤ و ۲۷٤ جفت باز بود. این اندازه‌ها در نمونه‌های بیمار تغییری را نشان نداد. محصولات PCR جهت انجام SSCP مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج الکتروفوز محصولات SSCP مرتبط با این سه اگزون روی ژل پلی اکریل آمید در اشکال ۲، ۳ و ٤ مشاهده می‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

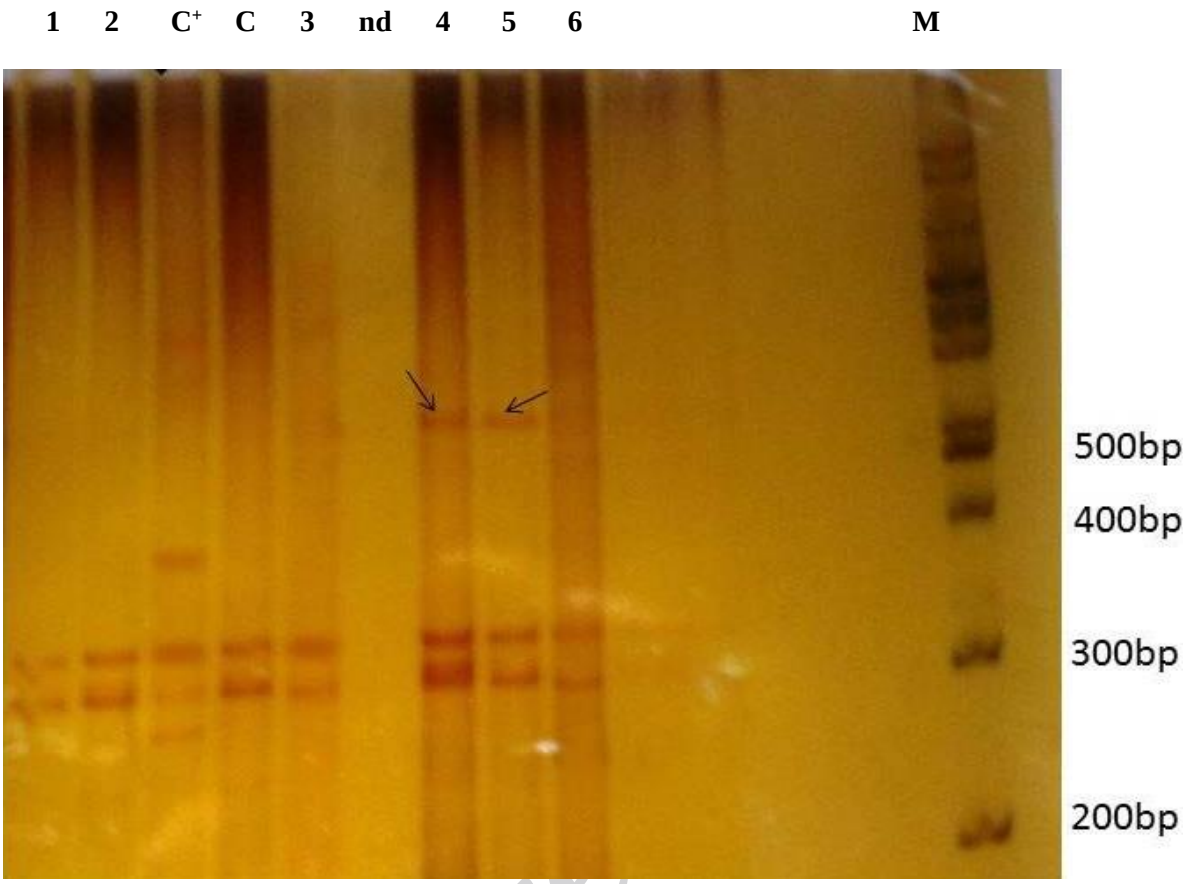


شکل ۱ ژل الکتروفورز محصولات PCR سالم و بیمار. از راست به چپ به ترتیب اگزونهای ۸ ، ۹ و ۳۰ ژن *Myh7*. ستون سمت راست در هر کدام از ژل‌ها مرتبط به مارکر DNA است. در دو ژل اول مارکر ۱۰۰ bp و ژل آخر مارکر ۱ kb استفاده شد. اندازه محصول PCR در پایین باندها نوشته شده است.



شکل ۲ محصولات PCR حاصل از اگزون ۸ روی ژل اکریل امید با تکنیک SSCP . M مارکر ۱۰۰ bp، nd کنترل واسرشته نشده، C+ نمونه کنترل دارای جهش، C نمونه کنترل سالم و ۱ تا ۹ نمونه‌های بیماران می‌باشد. الگوی متفاوت نمونه ۳ با پیکان علامت‌گذاری شد.

www.SID.ir

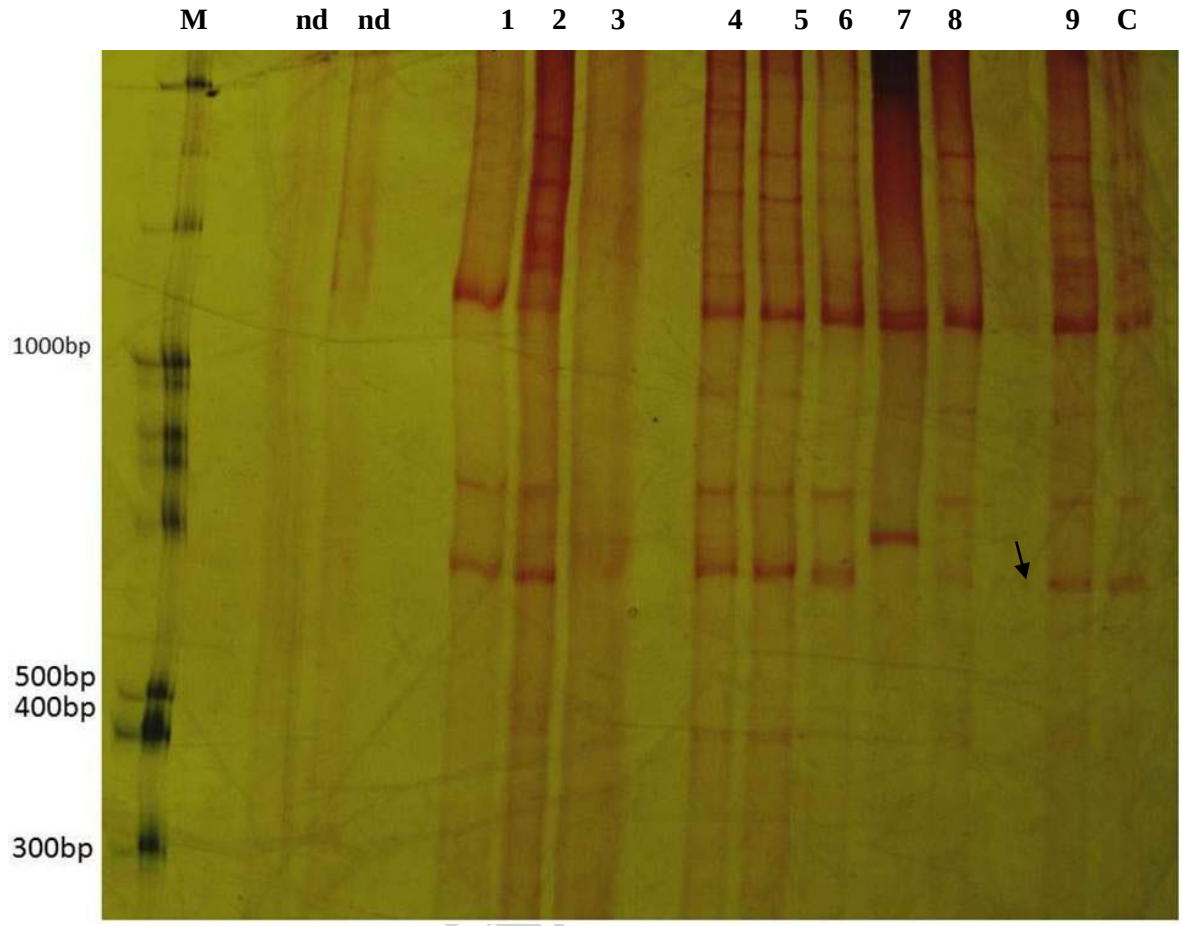


شکل ۳ محصولات PCR حاصل از اگزون ۹ روی ژل اکریل امید با تکنیک SSCP . M مارکر ۱۰۰ bp، nd کنترل واسرشته نشده، C+ نمونه کنترل دارای جهش، C نمونه کنترل سالم و ۱ تا ٦ نمونه‌های بیماران می‌باشد. الگوی متفاوت نمونه‌های ٤ و ٥ با پیکان علامت‌گذاری شدند.

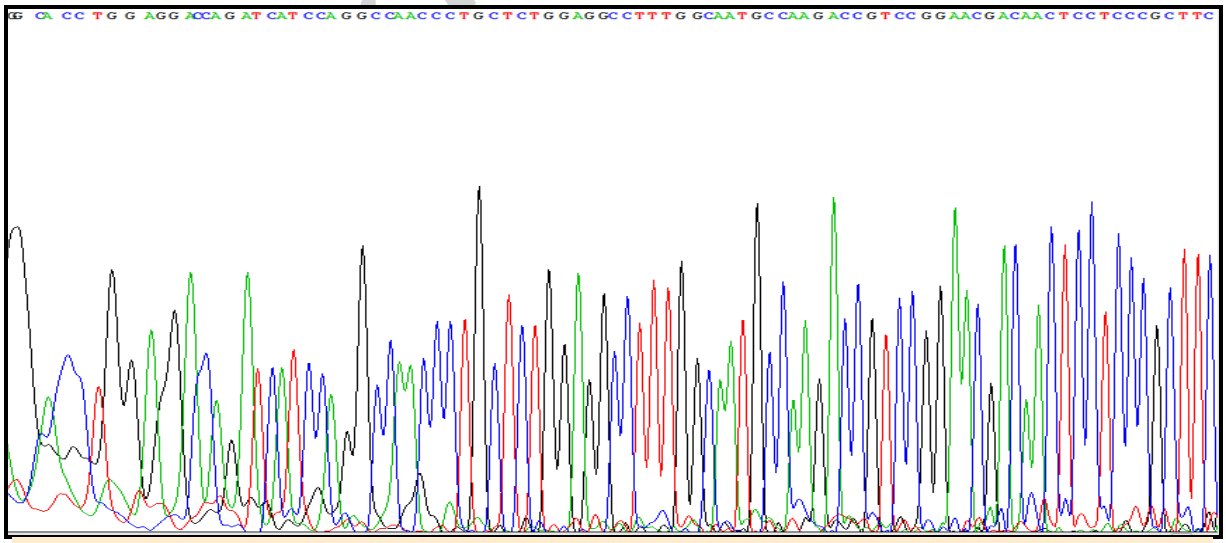
همان‌طور که در شکل‌ها مشاهده می‌شود هر کدام از ۳ اگزون ۸، ۹ و ۳۰ ژن *Myh7* دارای یک نمونه با ساختار ۳ بعدی متفاوت از نمونه کنترل سالم می‌باشند. ۳ نمونه بیمار دیگر (در عکس نیامده‌اند) که دارای الگویی مشابه با نمونه ۳ اگزون ۸ بودند ، نیز مشاهده گردید (شکل ۲). با توجه به مشاهدات در روش SSCP، ٤ نمونه در اگزون ۸، یک نمونه در اگزون ۹ و یکی در اگزون ۳۰ الگوی متفاوت باند را در مقایسه با نمونه کنترل سالم در ژل اکریل امید نشان دادند؛ در مابقی بیماران الگوی باند با نمونه‌های سالم از اگزون‌های مختلف مشابه بود. از آنجا که احتمال خطا در روش SSCP وجود دارد، مجموعاً این ٦ نمونه از اگزون‌های مختلف که تغییر باند در آن‌ها مشاهده شده بود، به همراه یک نمونه سالم مربوط به اگزون ۸ به عنوان کنترل برای اطمینان از حضور جهش با پرایمرهای پیشرو و معکوس تعیین توالی شدند.

اشکال ٥، ٦ و ۷ توالی یک نمونه مشکوک به جهش را بعد از توالی‌یابی برای هر یک از اگزون‌های ۸، ۹ و ۳۰ در مقایسه با توالی شاهد که از پایگاه NCBI برای آن اگزون بدست آمده نشان می‌دهد. مقایسه توالی این نمونه‌های توالی‌یابی شده با توالی شاهد عدم حضور جهش را نشان داد. بنابراین مرحله SSCP دارای خطا بود و این مسئله با انجام تعیین توالی آشکار شد.

Archive
www.SID.ir



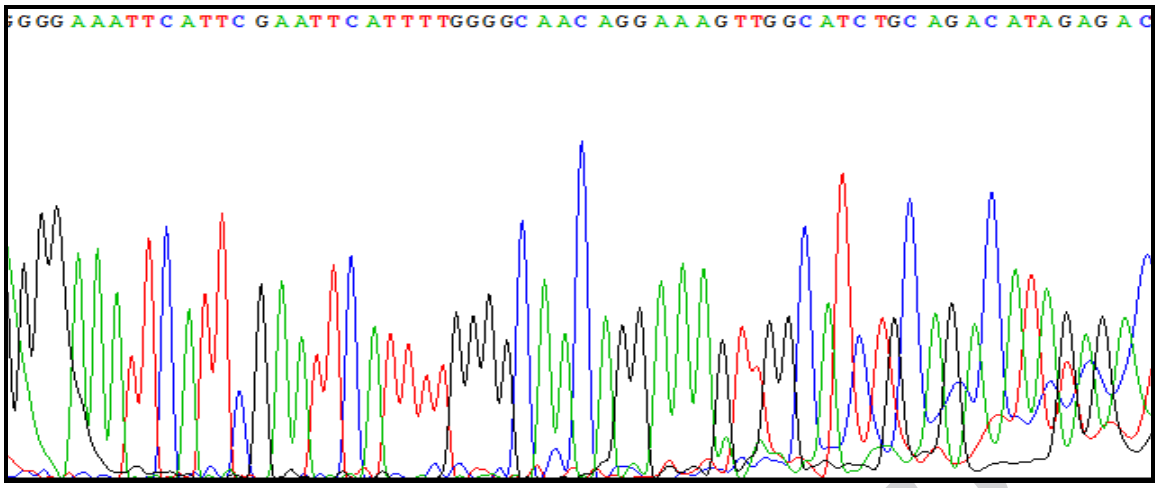
شکل ٤ محصولات PCR حاصل از اگزون ۳۰ روی ژل اکریل امید با تکنیک SSCP . M مارکر ۱۰۰ bp، nd کنترل واسرشته نشده، C نمونه کنترل سالم و ۱ تا ۹ نمونه‌های بیماران می‌باشد. الگوی متفاوت نمونه ۷ با پیکان علامت‌گذاری شد.



GGCACCCTGGAGGACCAGATCATCCAGGCCAACCCTGCTCTGGAGGCCTTTGGCAATGCCAAGACCGTCCGGAACGA
CAACTCCTCCCGCTTC

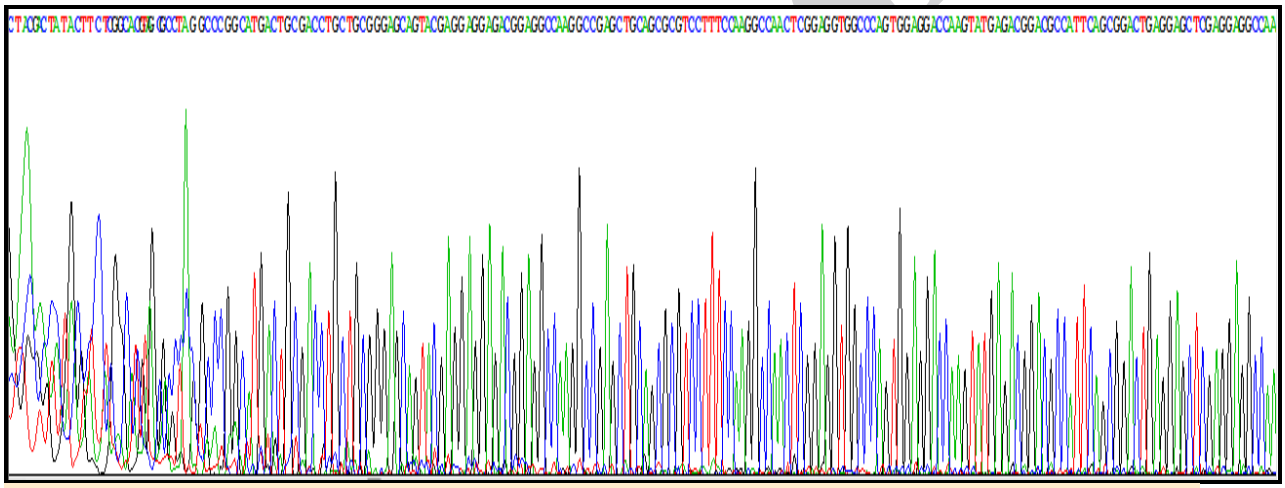
شکل ۵ الکتروفروگرام مربوط به نمونه مشکوک به جهش در اگزون ۸.

www.SID.ir



GGGAAATTCATTCGAATTCATTTTGGGGCAACAGGAAAGTTGGCATCTGCAGACATAGAGAC

شکل ٦ الکتروفروگرام مربوط به نمونه مشکوک به جهش در اگزون ۹.



GCGAAGAACGCCCTGGCCCACGCACTGCAGTCGGCCCGGCATGACTGCGACCTGCTGCGGGAGCAGTACGAGGAGG
AGACGGAGGCCAAGGCCGAGCTGCAGCGCGTCCTTTCCAAGGCCAACTCGGAGGTGGCCCAGTGGAGGACCA

شکل ۷ الکتروفروگرام مربوط به نمونه مشکوک به جهش در اگزون ۳۰.

٤- بحث و نتیجه‌گیری

هایپرتروفی کاردیومیوپاتی اختلال ژنتیکی اتوزوم غالب با شیوع ۱ در هر ۵۰۰ نفر است که با بزرگ شدن بطن چپ مشخص می‌شود و سالانه حدود ۱ درصد افراد در جهان به علت این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. *MYH7* مهمترین ژن عامل این بیماری می‌باشد که پروتئین میوزین را کد می‌کند. مولکول میوزین از نظر ساختاری شامل یک دم مارپیچ و خمیده، دو سر کروی شکل و ناحیه اتصال سربه دم می‌شود [۲۳]. مطالعات انجام شده تاکنون نشان داده است که جهش در اگزون‌های ۲٦-۸ این ژن که ناحیه سر و گردن پروتئین را کد می‌کنند بیشترین نقش را در به وجود آمدن بیماری HCM دارند. سر کروی محل جایگاه فعال آنزیم ATPase و به‌عنوان موتور حرکتی میوزین شناخته شده است؛ اگزون ۳۰ نیز که کد کننده ناحیه دم پروتئین میوزین است و در اتصال پروتئین‌های فرعی به یکدیگر نقش دارد، با

www.SID.ir

انواع خوشخیم بیماری HCM در ارتباط است [۲٤]. البته در جمعیت‌های مختلف در ایران هنوز به طور قطع آماری مشخص نشده است، بنابراین اطلاعات در رابطه با تأثیر این ژن بر کاردیومیوپاتی‌هایپرتروفی محدود است. به دلیل دخالت ژن‌های کدکننده پروتئین‌های سارکومری در ایجاد HCM به عنوان بیماری سارکومری نیز شناخته شده است [۲۵].

در مطالعه پیشین اگزون‌های ۱۲-۱۵ و ۱۹-۲۳ ژن *MYH7*، در بیماران HCM استان چهارمحال و بختیاری مرتبط با نواحی ذکر شده از پروتئین مورد بررسی قرار گرفتند [۲۸،۲۹]، ولی تنها ۳ مورد دارای جهش در این نواحی بودند. برای بهتر مشخص شدن نقش این ژن، ۳ اگزون دیگر آن در تحقیق فعلی در بیماران فوق مورد مطالعه قرار گرفتند. در این تحقیق اگزون‌های ۸ و ۹ ژن *MYH7* که در نقاط مستعد جهش و کد کننده ناحیه سر و محل اتصال سر به دم پروتئین بودند و اگزون ۳۰ که در ناحیه دم قرار داشت مورد بررسی قرار گرفتند که جزء نواحی درگیر در بیماری بوده‌اند و قبلاً جهش‌هایی در آن‌ها گزارش شده است [۲۹-۲٤].

برخی جهش‌ها در مطالعات روی ژن *MYH7* قبلاً گزارش شده است؛ گارسیاکاسترو و همکارانش در سال ۲۰۰۹ با بررسی جهش در ۵ ژن سارکومری دخیل در بیماری HCM در ۱۲۰ بیمار انتخاب شده، در ۳۲ نفر به روش توالی یابی اگزون‌ها، جهش‌هایی را شناسایی کردند که ۱۰ نفردر ژن *MYH7*، ۲۰ نفر در ژن *MYBPC3*، ۲ نفر در *TNNT2* و ۱ نفر در *TPM1* جهش داشتند. افراد دارای جهش در *MYH7* در مقایسه با افراد دارای جهش در *MYBPC3* هیچ تفاوتی در میانگین سنی و شدت‌هایپرتروفی نداشتند و بیشتر جهش‌ها در ژن *MYH7* در ۲۲ اگزون ابتدایی آن دیده شد [۲۰]. در تحقیق دیگری توسط این گروه روی اگزون‌های دو ژن *MYH7* و *TNNT2*، هتروژنی فنوتیپی بالا در حاملان جهش‌ها در این دو ژن مشخص شد. سه چندشکلی خاموش[1] نیز در اگزون ۸ ژن *MYH7* دیده شد [۲۵]. مطالعه دیگری که توسط ریچارد و همکارانش انجام شد، آنالیز ۱۹۷ بیمار غیر خویشاوند باکاردیومیوپاتی خودبه خودی یا ارثی بود؛ جهش‌های ایجادکننده بیماری در ۱۲٤ نفر تشخیص داده شد و ۹۷ جهش مختلف ازجمله ٦۰ جهش جدید شناسایی شد. ژن *MYH7* دارای ٤۰٪ جهش‌ها بود. دراین مطالعه، جهش دراگزون‌های ۹، ۱٦ و ۲۳ هرکدام در یک بیمار گزارش شد؛ ۳ بیمار با جهش در اگزون ۸، ۳ مورد با جهش‌های مختلف در اگزون ۳۰ و بقیه در اگزون‌ها و ژن‌های مورد بررسی دیگر شناسایی شدند و از جهش‌های یافت شده در ژن *MYH7* ، ٤۱٪ ارثی و ۳۳٪ خودبخودی گزارش شد [۲۳]. در تحقیق دیگری توسط ون درایست و همکاران جهش N232S در اگزون ۸ و G256E در اگزون ۹ شناسایی شد که با نوع خوشخیم بیماری HCM در ارتباط بود [۳۱]. همچنین جهش Arg249Glu در اگزون ۹ در مطالعه مولمن و همکاران مشخص شد که با نوع حدواسط بیماری HCM مرتبط بود [۳۲]. در مطالعه بریتو و همکاران که روی ۵ ژن سارکومری مرتبط با HCM در۷۷ بیمار و خانواده‌های آن‌ها در کشور پرتغال با روش PCR-Sequencing انجام گرفت، ۲۲٪ جهش‌ها در *MYH7* بودند. در اگزون ۳۰ ژن *MYH7* نیز جهش E1356K دیده شد که مرتبط با HCM با سابقه خانوادگی بود (۳۳). سه جهش ایجاد کننده بیماری در ناحیه دم با استفاده از روش SSCP در مطالعه‌ی هوگز و همکاران مشاهده شد. همه‌ی جهش‌ها جدید بودند و گفته شد جهش در ناحیه دم نیز با بیماری HCM مرتبط است. جهش N1327K در اگزون ۳۰ نیز در این مطالعه گزارش شد [۳٤].

توالی‌یابی کامل ژن *MYH7* شامل نواحی اینترونی و ترجمه نشده در ٦۰ بیمار HCM توسط کوتو و همکاران،

[1] Silent polymorphism

www.SID.ir

جهش‌های نادری در پروموتر و یک جهش در ´۳ UTR را نشان داد که بیان‌کننده این بود که جهش در *MYH7* علاوه بر اگزون‌ها و نواحی کدکننده، به‌ندرت در نواحی غیرکدکننده نیز روی می‌دهد [۳۵]. همچنین در مطالعه گروهی از بیماران در برزیل توسط کارنیرو و همکاران روی بیماری HCM ، ۳ پلی مورفیسم در اینترون‌های ژن *MYH7* یافت شد که دو تا در اینترون ۱۹ و یکی در اینترون ۲۲ این ژن دیده شد [۳٦].

با این وجود در ایران مطالعات اندکی در ارتباط با اهمیت و نقش جهش‌های ژن *MYH7* انجام شده است؛ در مطالعه صورت گرفته توسط منتظری و همکاران، از ۵۰ بیمار دارای‌هایپرتروفی، در ١٤ نفر جهش‌هایی شناسایی شد که ۳ نفر در اگزون‌های ۱۳ ،١٤ ، ۱۹ و بقیه در اینترون‌های ۱۳، ١٤، و ۱۹ و۲۰ دارای جهش بودند. در میان جهش‌ها یک جهش جدید هم گزارش شد. جهش در *MYH7* در بیماران بدون سابقه خانوادگی بیماری نیز دیده شد [۳۷]. در تحقیق صورت گرفته روی اگزون‌های ۱۲-۱۵ و ۱۹-۲۳ ژن *MYH7*، در استان چهارمحال و بختیاری توسط حیدری و همکاران، ۲ نفر در اگزون ۱۹ و یک نفر در اگزون ۲۲ این ژن جهش داشتند و در ٦ نفر چند شکلی خاموش در اگزون ۱۲ این ژن شناسایی شد [۲۹،۳۰].

از ۲۷ نمونه مورد بررسی در مطالعه حاضر توصیفی-آزمایشگاهی که ١٤ نفر دارای سابقه خانوادگی از بیماری و ۱۳ نفر بدون سابقه فامیلی بیماری بودند، در ۷ نمونه تغییراتی در باندهای تشکیل شده در این ۳ اگزون روی ژل SSCP مشاهده شد که با بقیه نمونه‌ها اختلاف داشتند. سپس این موارد متعاقباً تعیین توالی شدند، اما نتایج مورد تأیید قرار نگرفتند که احتمالاً به‌علت خطا در روش SSCP است؛ همچنین این تغییر می‌تواند به علت خطای آنزیم پلیمراز در تکثیر توالی‌های نوکلئوتیدی تکراری پشت سرهم صورت گیرد. البته در هنگام توالی یابی از پرایمرهای پیشرو و پیرو استفاده شد؛ بنابراین احتمال بروز این خطا به حداقل ممکن کاهش داده شد. این نتیجه می‌تواند دلالت بر حضور احتمالی جهش در اگزون‌های دیگر این ژن یا اینترون‌های آن و یا حضور احتمالی جهش در ژنهای دیگر مرتبط باشد که باید در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

براساس فرمول کوکران (۳۸) تعداد افراد مورد بررسی می‌بایست حدود ۵۰ نفر می‌بود، اما چون تعداد مراجعه کنندگان به کلینیک قلب بیمارستان‌هاجر شهرکرد در زمان مورد بررسی از ۲۷ نفر بیشتر نبود با همین تعداد بررسی انجام گرفت. احتمالاً سایر بیماران به مراکز دیگر درمانی در شهرهای مجاور و غیر مجاور مراجعه کرده‌اند؛ همچنین چون بیماری می‌تواند ماهیت ارثی داشته باشد، بررسی بیش از یک نفر از یک خانواده احتمالاً موتاسیون مشابه را نشان خواهد داد..

برای یافتن جهش، بهترین روش تعیین توالی مستقیم می‌باشد، اما به دلیل هزینه زیاد و زمان‌بر بودن آن، دارای محدودیت می‌باشد. استفاده از روش PCR-SSCP روش مناسبی است، اگرچه دقت آن ۱۰۰ درصد نیست و در هر صورت خطاهای آزمایشگاهی تأثیر بسیار زیادی در نتایج حاصل از این روش به همراه دارد. با این‌حال، استفاده از نمونه‌های کنترل مثبت می‌تواند از میزان خطا در نتایج حاصل کم کند. همچنین با تعیین توالی توأم و کاربرد روش‌های هم‌زمان برای شناسایی جهش می‌توان دقت کار را بسیار بالا برد.

با توجه به اینکه در این مطالعه تغییری در اگزون‌های ۸، ۹ و ۳۰ ژن *MYH7* مشاهده نشد، می‌توان گفت که جهش در این اگزون‌ها در ایجادهایپرتروفی کاردیومیوپاتی در جمعیت مطالعه شده در استان چهارمحال و بختیاری تأثیرگذار نیست، اما می‌بایست مطالعات بیشتری روی تعداد نمونه‌های بیشتر برای نتیجه‌گیری کلی درباره این استان انجام گیرد؛ همچنین باید اگزون‌های بررسی نشده از این ژن نیز مطالعه شود و نقش تمام اگزون‌ها و

Archive of SID
www.SID.ir

همچنین اینترون‌ها در بیماری و ارتباط این ژن با بیماری به‌طور مشخص روشن و معلوم گردد.

۵- سپاسگزاری

بدینوسیله از خانم سهیلا بادفر پرسنل بخش اکوکاردیوگرافی بیمارستان‌هاجر استان چها رمحال و بختیاری و کلیه بیماران که صمیمانه ما را در اجرای این مطالعه یاری رساندند، تشکر می‌شود. این مطالعه در دانشگاه شهرکرد و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. قسمتی از کار تحقیقاتی در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد صورت گرفت.

٦- منابع

[1] Maron B. Hypertrophic Cardiomyopathy: A Systematic Review. Clinical cardiology ۲۰۰۲;۲۸۷:۱۳۰۸-۲۰.

[2] Hartmannova H, Kubanek M, Sramko M, Piherova L, Noskova L, Hodanova K, et al. Isolated X-Linked Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by a Novel Mutation of the Four-and-a-Half LIM Domain 1 Gene. Circulation: Cardiovascular Genetics. ۲۰۱۳;٦:٥٤٣-٥١.

[3] Watkins H, Thierfelder L, Hwang D, McKenna W, Seidman J, Seidman C. Sporadic Hypertrophic Cardiomyopathy Due to De Novo Myosin Mutations. Journal of clinical investigation. 1992;90:1666-71.

[4] S M. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. Cardiovascular Research. ۲۰۰۸;۷۷:٦٥٩-٦٦.

[5] Richard P, Villard E, Charron P, Isnard R. The Genetic Bases of Cardiomyopathies. American College of Cardiology. 2006;48:A79-A89.

[6] Marian A. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. Current Opinion in Cardiology. 2002;17:242-52.

[7] Walsh R, Rutland C, Thomas R, Loughna S. Cardiomyopathy: A Systematic Review of Disease-Causing Mutations in Myosin Heavy Chain 7 and Their Phenotypic Manifestations. Cardiology. 2010;115:49–60.

[8] Kitaoka H, Kubo T, Okawa M, Takenaka N, Baba Y, Yamasaki N, et al. Plasma metalloproteinase levels and left ventricular remodeling in hypertrophic cardiomyopathy in patients with an identical mutation. Journal of Cardiology. 2011;58:261-5.

[9] Ashrafian H, McKenna W, Watkins H. Disease Pathways and Novel Therapeutic Targets in Hypertrophic Cardiomyopathy. Circulation Research. 2011;109:86-96.

[10] Bobkowski W, Sobieszczañska M, TurskaKmieæ A, Nowak A, Jagielski J, Gonerska M, et al. Mutation of the MYH7 gene in a child with hypertrophic cardiomyopathy and Wolff-Parkinson-White syndrome. Journal of Applied Genetics. ۲۰۰۷;٤٨:١٨٥-٨.

[11] Wheeler M, Pavlovic A, DeGoma E, Salisbury H, Brown C, Ashley E. A New Era in Clinical Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy. Journal of Cardiovascular Translational Research. 2009;2:381-91.

[12] Dimitrow P, Chojnowska L, Rudzinski T, Piotrowski W, Ziołkowska L, Wojtarowicz A, et al. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: old risk factors re-assessed in a new model of maximalized follow-up. European Heart Journal. 2010;31:3084-93.

[13] Driest SV, Jaeger MA, Ommen SR, Will ML, Gersh BJ, Tajik AJ, et al. Comprehensive Analysis of the Beta-Myosin Heavy Chain Gene in 389 Unrelated Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. Journal of the American College of Cardiology. 2004;44:602-10.

[14] Tanjore R, RangaRaju A, Vadapalli S, Remersu S, Narsimhan C, Nallari P. Genetic variations of β-MYH7 in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. Indian Journal of Human Genetics. ۲۰۱۰;١٦(٢):٦٧-٧١.

[15] Mora R, Merino JL, Peinado R, Olias F, García-Guereta L, del Cerro MJ, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy: Infrequent Mutation of the Cardiac Beta-Myosin Heavy-Chain Gene. Revista Española de Cardiología (English Version). 2006;59(08):846-9.

[16] Armel TZ, Leinwand LA. Mutations in the β-myosin rod cause myosin storage myopathy via multiple mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009;106(15):6291-6.

[17] Wolny M, Colegrave M, Colman L, White E,

Archive of SID
www.SID.ir

[26] Cotiga D, Ehlert F, Sherrid M. Syncope, other risk factors, and the implantable defibrillator for sudden death prevention in hypertrophic cardiomyopathy. The Anatolian Journal of Cardiology. 2006;6:55-60.

[27] Taylor M, Carniel E, Mestroni L. Familial hypertrophic cardiomyopathy: clinical features, molecular genetics and molecular genetic testing.expert review of molecular diagnostics. 2004;4:99-113.

[28] Gasser RB, Hu M, Chilton NB, Campbell BE, Jex AJ, Otranto D, et al. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. Nature Protocols. ۲۰۰۷;۱(٦):۳۱۲۱-۸.

[29] Heydari S, Khaledifar A, Pourahmad R, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Heydari S, Bagheri N, et al. Investigation of mutations in exons 19-23 MYH7 gene in hypertrophic cardiomyopathy patients using PCR-SSCP/HA technique in Chaharmahal va Bakhtiari province. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences. 2013;15(4):35-44.

[30] Heydari S, Pourahmad R, Khaledifar A, Hashemzadeh M, Amini Z, Badfar S, et al. Investigation of Mutations in Exons 12-15 MYH7 Gene in Hypertrophic Cardiomyopathie Patients Using PCR-SSCP Technique. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2013;15(10):16-20.

[31] Van Driest SL, Ackerman MJ, Ommen SR, Shakur R, Will ML, Nishimura RA, et al. Prevalence and Severity of "Benign" Mutations in the β-Myosin Heavy Chain, Cardiac Troponin T, and α-Tropomyosin Genes in Hypertrophic Cardiomyopathy. Circulation. 2002;106(24):3085-90.

[32] Moolman-Smook JC, De Lange WJ, Bruwer ECD, Brink PA, Corfield VA. The Origins of Hypertrophic Cardiomyopathy–Causing Mutations in Two South African Subpopulations: A Unique Profile of Both Independent and Founder Events. American Journal of Human Genetics. 1999;65(5):1308-۲۰.

[33] Brito D, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Silva D, Diogo A, Madeira H. Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: genetic profile in a Portuguese population. Revista portuguesa de cardiologia. 2012 31(9):577-87.

[34] Hougs L, Havndrup O, Bundgaard H, Kober L, Vuust J, Larsen LA, et al. One third of Danish hypertrophic cardiomyopathy patients have Knight PJ, Peckham M. Cardiomyopathy Mutations in the Tail of β-Cardiac Myosin Modify the Coiled-coil Structure and Affect Integration into Thick Filaments in Muscle Sarcomeres in Adult Cardiomyocytes. The Journal of Biological Chemistry. ۲۰۱۳;۲۸۸(٤٤):۳۱۹٥۲-٦۲.

[18] Blair E, Redwood C, de Jesus Oliveira M, Moolman-Smook JC, Brink P, Corfield VA, et al. Mutations of the Light Meromyosin Domain of the β-Myosin Heavy Chain Rod in Hypertrophic Cardiomyopathy. Circulation Research. 2002;90(3):263-9.

[19] Havndrup O, Bundgaard H, Andersen P, Larsen L, Vuust J, Kjeldsen K, et al. Outcome of clinical versus genetic family screening in hypertrophic cardiomyopathy with focus on cardiac β-myosin gene mutations Cardiovascular Research. 2003;57:347-57.

[20] GarciaCastro M, Coto E, Reguero J, Berrazueta J, Alvarez V, Alonso B, et al. Mutations in Sarcomeric Genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. Revista Española de Cardiología. ۲۰۰۹;٦۲(۱):٤۸-٥٦.

[21] Havndrup O, Bundgaarda H, Andersen P, Larsen L, Vuust J, Kjeldsen K, et al. Outcome of clinical versus genetic family screening in hypertrophic cardiomyopathy with focus on cardiac b-myosin gene mutations. Cardiovascular Research. 2003;57:347–357.

[22] Maron B, Maron M, Semsarian C. Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy After 20 Years: Clinical Perspectives. Journal of the American College of Cardiology. 2012;60:705-15.

[23] Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of Disease Genes, Spectrum Of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy. Circulation. 2003;107:2227-32.

[24] tajshahri H, oldfores A. myosinopathies: pathology and mechanism. acta neuropathologica. ۲۰۱۳;۱۲٥:۳-۱۸.

[25] GarciaCastro M, Reguero J, Batalla A, azMolina B, lez P, Alvarez V, et al. Hypertrophic Cardiomyopathy: Low Frequency of Mutations in the β-Myosin Heavy Chain (MYH7) and Cardiac Troponin T (TNNT2) Genes among Spanish Patients. Clinical Chemistry. 2003;49(8):1279-85.

Archive of SID

www.SID.ir

mutations in MYH7 rod region. **European Journal of Human Genetics**. 2004;13(2):161-۵.

[35] Coto E, Reguero J, Palacín M, Gómez J, Alonso B, Iglesias S, et al. Resequencing the Whole MYH7 Gene (Including the Intronic, Promoter, and 3′ UTR Sequences) in Hypertrophic Cardiomyopathy. Journal of molecular diagnostics. 2012;14(5):518-24.

[36] MarsigliaI JC, BatitucciI MP, PaulaI; Fd, BarbiratoI C, ArteagaII E, Araújo AQd. Study of mutations causing hypertrophic cardiomyopathy in a group of patients from Espirito Santo, Brazil. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2010;94:7-10

[37] Montazeri M, Houshmand M, Mandeger M, GhaniKakhki M, Estahbanati G, Nouhi F, et al., editors. Investigations of hot spot regions in MYH7 genes in Iranian hypertrophic cardiomyopathy patients. Proceeding of the 4PthP national biotechnology congress. 2005; Kerman University of Medical Sciences

[38] Taborsky M. Sample size in the study of behaviour. Ethology. 2010;116:185-202.

Archive of SID

www.SID.ir