

Investigation of Mutations in Exons 15 and 18 of *MYBPC3* Gene in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients

Behnaz Sadat Abedi¹, Seyedeh Zohreh Kiyani¹, Morteza Hashemzadeh Chaleshtori^{2*},
Shahrbanoo Parchami³, Abbas Doosti⁴

1- Department of Genetics, Shahrekord Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Department of Human Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

3- Department of Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

4- Department of Genetics, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Azad University, Shahrekord, Iran.

Received: 21 Jan 2015, Accepted: 10 March 2015

Abstract

Background: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a various collection of heart diseases with autosomal dominant inheritance affecting 0.2% of the global population. HCM is also the most common cause of sudden cardiac death in individuals younger than 35 years old. Approximately, 40% of affected cases are associated with *MYBPC3* gene. The aim of this study is to investigate the possible presence of mutation in 15 and 18 exons of *MYBPC3* gene in patients with HCM in Chaharmahal Va Bakhtiyari province.

Materials and Methods: In this experimental study, 30 HCM patients were selected. DNA was extracted using standard phenol-chloroform method. Certain exons were amplified by PCR method. And then, SSCP and HA methods were run.

Results: Significant differences were observed between the positive control samples and other samples. However, there were no difference in studied exons or shift in the bands.

Conclusion: Mutations in the exons of *MYBPC3* gene may cause the HCM disease, and change in other exons may be the causative agent in this geographical region and change in this studied exons may not have contributed to the HCM disease. However, it is necessary to study more patients for getting a better conclusion.

Keywords: Heteroduplex analysis, Hypertrophic cardiomyopathy, Myosin-binding protein C3 Mutation, Single-stranded conformational polymorphism.

*Corresponding Author:

Address: Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

Email: mchalesh@yahoo.com

بررسی جهش در اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ ژن *MYBPC3* در بیماران کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک

بهناز سادات عابدی^۱، سیده زهره کیانی^۱، شهربانو پرچی^۲، مرتضی هاشم‌زاده چالستری^{۳*}، عباس دوستی^۴

۱- کارشناس ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲- کارشناس ارشد، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۳- استاد، گروه ژنتیک انسانی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۴- استاد، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک (HCM) مجموعه‌ای متنوع از بیماری‌های قلبی با توارث اتوزومی غالب است که ۰/۲ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر قرار داده و شایع‌ترین علت مرگ قلبی ناگهانی در جوانان زیر ۳۵ سال می‌باشد. حدود ۴۰ درصد از موارد بیماری مربوط به جهش در ژن *MYBPC3* است. هدف از این مطالعه بررسی جهش‌های ژن *MYBPC3* در اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ بیماران HCM در استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی ۳۰ بیمار مبتلا به HCM انتخاب شدند. DNA به روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج شد، سپس اگزون‌های مورد نظر با استفاده از روش PCR تکثیر گردیدند. سپس مراحل SSCP و HA انجام گرفت.

یافته‌ها: تفاوت آشکاری بین نمونه‌های کنترل مثبت و سایر نمونه‌ها مشاهده گردید. اما هیچ تفاوتی در اگزون‌های مورد بررسی و یا شیفت باندها وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: جهش در اگزون‌های ژن *MYBPC3* می‌تواند باعث بروز HCM شود و احتمالاً تغییر در سایر اگزون‌ها عامل بیماری در این منطقه جغرافیایی است و تغییر در اگزون‌های مورد بررسی سهم به‌سزایی در بیماران مبتلا به HCM ندارد. در هر صورت، لازم است برای رسیدن به نتیجه‌ی بهتر بیماران بیشتری مورد مطالعه قرار گیرند.

واژگان کلیدی: آنالیز هترو دوپلکس، کاردیومیوپاتی هایپر تروفیک، پروتئین C3 باند شده به میوزین، جهش، چند شکلی ساختار تک رشته‌ای

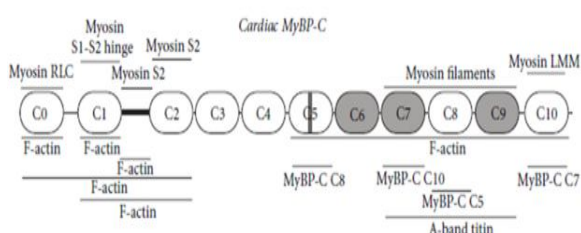
*نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

Email: mchalesh@yahoo.com

مقدمه

کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک (HCM) مجموعه‌ای متنوع از بیماری‌های عضله قلب در ارتباط با اختلال عملکرد مکانیکی-الکتریکی قلب و نارسایی قلبی است که دارای وراثت مندلی می‌باشد و به عنوان یک صفت آتوزومال غالب در هر دو جنس زن و مرد دیده می‌شود، با این وجود در فرکانس بسیار پایین‌تر آتوزومال مغلوب و X مغلوب نیز گزارش شده است. هم‌چنین رایج‌ترین علت مرگ قلبی ناگهانی در جوانان زیر ۳۵ سال است. ۰/۲ درصد از جمعیت جهان تحت تأثیر این بیماری قرار دارند (۱). این بیماری به دو شکل اولیه و ثانویه وجود دارد. نوع اولیه آن در اثر عواملی چون تنگی آئورت، تمرینات ورزشی، استفاده از بعضی از داروها و یا فشارخون اتفاق می‌افتد (۲، ۳) و نوع ثانویه آن اغلب به صورت فامیلی بوده و بر پایه توارث آتوزومی غالب انتقال می‌یابد (۴). به طور کلی HCM به این شکل تعریف می‌شود: افزایش توده عضلانی بطن چپ و یا راست که معمولاً نامتقارن است و دیواره‌ی بین دو بطن یعنی سپتوم را درگیر می‌کند و پروتئین‌های انقباضی سارکومر را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۵). این بیماری با بی‌نظمی سارکومری، به هم ریختگی میوفیبریل‌ها، افزایش حجم دیواره بین بطنی مشخص می‌شود و با کاهش فضای بطن چپ، اختلال دیاستول، ایسکمی میوکارد، ضربان نامنظم قلب و مرگ ناگهانی همراه است (۶). بیماری دارای ناهمگنی فنوتیپی بالایی است و آنالیز پیوستگی ژن‌ها، اولین شاهد ناهمگنی لوکوسی و آللی این بیماری است. علائم بالینی از هایپرتروفی شدید تا شکل خوش‌خیم آن که در ناقلین دیده می‌شود متغیر است. آریتمی و مرگ ناگهانی در غیاب علائم اکوکاردیوگرافی هایپرتروفی بطن چپ، در بیماران دارای ژنوتیپ بیماری‌زا، نشان دهنده نفوذ ناقص فنوتیپی است (۷-۹). از هر ۵۰۰ نفر از کل جمعیت، ۱ نفر به این بیماری مبتلا می‌شود. این بیماری در تمامی سنین و از ابتدای تولد تا دهه ۸۰ زندگی بروز می‌یابد (۱۰). از آنالیز ژنتیکی می‌توان به منظور تسهیل تشخیص بیماری در مراحل پیش کلینیکی، رد بیماری فنوکپی و تشخیص جهش خاص

استفاده نمود. تحقیقات زیادی جهت تشخیص مبنای ژنتیکی کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک انجام گرفته است که نتایج آن شناسایی بیش از ۹۰۰ جهش تقریباً در ۲۰ ژن بوده است که اغلب این ژن‌ها کد کننده پروتئین‌های سارکومری می‌باشند. هستند (۱۱). یکی از شایع‌ترین علل کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک، جهش در ژن MYBPC3 می‌باشد که این ژن کد کننده پروتئین C متصل شونده به میوزین است. در بیش از ۴۰ درصد از موارد، نقص در این ژن موجب کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک می‌شود. جایگاه سیتوژنیک این ژن، 11p11.2 در نزدیکی ساترومر و جایگاه مولکولی آن بر روی کروموزوم ۴۷۳۵۲۹۵۷ تا ۴۷۳۷۴۲۵۳ می‌باشد (۱۲). طول این ژن، ۲۱۲۹۶ جفت باز شامل ۳۵ اگزون است که ۳۴ تای آن‌ها کد کننده پروتئین ۱۱۷۲ اسید آمینه‌ای cMYBP-C با وزن ۲۱ کیلو دالتون می‌باشند. این پروتئین دارای ۱۱ دمین گلوبولار (۸ دمین Ig و ۳ دمین فیبرونکتین) است (شکل ۱). cMyBP-C بزرگ‌ترین جزء پروتئینی سارکومر عضلانی است که تنها در قلب پستانداران بیان شده است (۱۳).



شکل ۱. نمای شماتیک از پروتئین cMYBP که در آن دمین‌های مشابه ایمونوگلوبولین و فیبرونکتین به ترتیب با رنگ سفید و خاکستری نشان داده شده‌اند. هم‌چنین مناطق اتصال هر دمین مشخص شده‌اند.

این پروتئین دارای نقش ساختاری (مونتاز و تنظیم رشته‌های ضخیم) در میوسیت و سارکومرهای قلبی و هم‌چنین دارای نقش تنظیمی در کنترل انقباض قلب است (۴، ۱۴). اگزون‌های انتخاب شده (اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ ژن MYBPC3) نقش موثری در ساختار پروتئین دارند. هم‌چنین برخی از شایع‌ترین جهش‌ها و نقاط داغ در این

اگزون‌ها (۱۵ و ۱۸ ژن MYBPC3) یافت می‌شوند (۱۵). اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ به ترتیب در کد کردن دمین C2 و C3 نقش دارند که این دمین‌ها در ناحیه C-ترمینال قرار گرفته‌اند. C-ترمینال پروتئین cMYBP-C در پایداری فیلامنت‌های ضخیم بسیار با اهمیت است (۱۶). با توجه به این که مطالعات اندکی در ارتباط با اساس مولکولی این بیماری در ایران صورت گرفته است، از این رو، این مطالعه با هدف بررسی احتمال حضور جهش در اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ ژن MYBPC3 در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک طراحی ریزی و اجرا شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی-آزمایشگاهی است که در فاصله زمانی آذر ماه ۱۳۹۲ تا شهریور ماه ۱۳۹۳ انجام گرفت. از بین مراجعه کنندگان به کلینیک قلب دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و بر اساس یافته‌های بالینی و اکوکاردیوگرافی (۱۷)، ۳۰ بیمار از ۳۰ خانواده مبتلا به کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک انتخاب شدند و مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از تهیه پرسش‌نامه و کسب رضایت‌نامه کتبی از بیماران مبتلا به HCM جهت انجام آزمایشات

جدول ۱. آغازگرهای طراحی شده برای انجام واکنش SSCP

نام اگزون	اندازه قطعه	نوع آغازگر	(۳' → ۵') توالی آغازگر
اگزون ۱۵	۲۷۵ bp	پیشرو	۵' GGGGCACAGGGATTATCACGG ۳'
		معکوس	۵' GTCCAGGCAGGGTGAGCATGA ۳'
اگزون ۱۸	۲۹۲ bp	جهش پیشرو	۵' GGGGCACAGGGATTGTCCACGG ۳'
		پیشرو	۵' CACAGGGATTACGCCACAC ۳'
اگزون ۱۸	۲۹۲ bp	معکوس	۵' TCTCTGTTTCTCCCTGTGTCTCTC ۳'
		جهش پیشرو	۵' CACAGGGATTACACCACAC ۳'

مولکولی، ۵ میلی‌لیتر خون محیطی از هر بیمار در لوله‌های حاوی دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) نیم مولار ریخته شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس DNA خون بیماران به روش استاندارد فنل-کلروفرم استخراج گردید (۱۸). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری (NANODROP 2000، امریکا) بررسی گردید. هم‌چنین با استفاده از توالی ژن MYBPC3 (Accession: Y10129.1GI: 2058321) و با استفاده از نرم‌افزار Primer3، توالی‌های آغازگر پیشرو و آغازگر معکوس برای اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ این ژن طراحی و خریداری گردیدند. علاوه بر این، از آغازگرهایی با جهش‌های ساختگی به عنوان کنترل مثبت جهت افزایش دقت تکنیک چند شکلی ساختار تک رشته‌ای (SSCP) استفاده شد. به این صورت که یک نوکلئوتید (ترجیحاً بازهای پیریمیدین T به C و C به T و بعضاً بازهای پورین) از انتهای ۴ تا ۶ نوکلئوتیدی در انتهای ۳' آغازگر پیشرو تغییر داده شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای هر اگزون به صورت اختصاصی و به منظور تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت.

برای تکثیر نواحی مورد نظر، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Astec, PC818)، ژاپن انجام شد. هر میکروتیوب واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (10X)، ۲ میکرولیتر (۴ میلی‌مولار) کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۷ میکرولیتر (۰/۲۸ میلی‌مولار) از مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (با

غلظت ۱۰۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر از DNA ژنومیک، ۰/۱۵ میکرولیتر (۰/۷۵ واحد) از آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد بر میکرولیتر) بود که با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

تکنیک چندشکلی ساختار تک رشته‌ای بر این اساس استوار است که DNA تک رشته‌ای با توجه به ترکیب بازی خود می‌تواند حالت و آرایش‌های فضایی

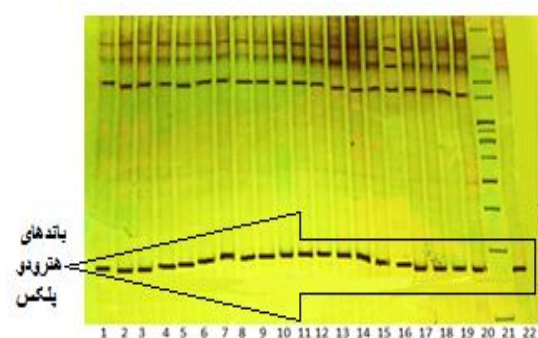
شد و باندهای DNA به دست آمده بر روی هر ژل مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های مشکوک یک بار دیگر بر روی ژل برده شدند و یکسان بودن آن‌ها تأیید شد.

جدول ۲. شرایط تنظیم شده برای انجام الکتروفورز SSCP اگزون‌های ۶ و ۱۵ ژن MYBPC3

اگزون	غلظت ژل	زمان	جریان	دما
اگزون ۱۵	۱۴٪	۱۲ ساعت	۳۰ میلی آمپر	C۱۲
اگزون ۱۸	۱۲٪	۸ ساعت	۲۹ میلی آمپر	C۱۸

یافته‌ها

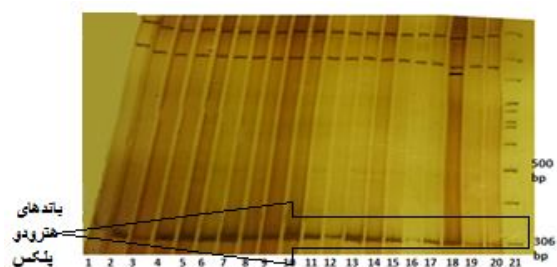
در این مطالعه، ۳۰ فرد بیمار از ۳۰ خانواده (۱۵ زن و ۱۵ مرد) با میانگین سنی ۴۰ سال و دامنه سنی ۱۷ تا ۸۰ سال مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران براساس ضخامت دیواره بطن چپ در سه گروه ۱۳ تا ۱۶، ۱۷ تا ۱۹ و بیش از ۱۹ میلی‌متر قرار گرفتند. تشخیص بالینی بیماری در کلیه‌ی بیماران مورد مطالعه صورت گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز SSCP محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، نشان دهنده حرکت متفاوت باندهای نمونه کنترل مثبت نسبت به نمونه‌های مورد مطالعه بیماران بود. این تفاوت در هر دو اگزون مشاهده شد، اما موارد مشکوکی در نمونه‌های بیماران دیده نشد و حرکت باندهای واسرشته شده بدون تفاوت با یکدیگر در یک راستا بود (شکل ۲).



شکل ۲ الف. ژل پلی‌آکریل آمید واکنش SSCP اگزون ۱۵. چاهک‌های شماره ۱ تا ۲۰: نمونه‌های مورد مطالعه. چاهک شماره ۲۱: مارکر. چاهک شماره ۲۲: نمونه کنترل مثبت.

متفاوتی به خود بگیرد. بنابراین اگر در DNA نرمال تغییری رخ داده باشد، باعث تغییر در آرایش فضایی تک رشته‌ای آن می‌شود که بر اساس تفاوت حرکت آن روی ژل پلی‌آکریل آمید قابل تشخیص است. هم‌چنین، به طور هم‌زمان، از تکنیک آنالیز هترو دو پلیکس (HA) برای افزایش حساسیت تشخیص و شناسایی جهش‌های احتمالی استفاده شد. بعد از تکثیر قطعات مورد نظر از طریق تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، نمونه‌های مورد نظر با جریان ۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۱ ساعت بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۸ درصد الکتروفورز شدند، سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی شدند و باندهای ایجاد شده مشاهده گردیدند (۱۹). پس از مقایسه و تأیید باندهای به دست آمده با مارکر، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به آن‌ها جهت SSCP مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام SSCP، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هر نمونه برداشته شد و با ۶ میکرولیتر SSCP (۹۰ درصد فرم آمید، ۱۰ میلی مولار EDTA (pH=۸)، ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر زایلین سیانول، ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بر موفنول) مخلوط گشت و زایلین سیانول، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. این کار به منظور جدا شدن کامل دو رشته DNA صورت گرفت. سپس نمونه‌ها بلافاصله بر روی یخ منتقل شدند تا از اتصال مجدد تک رشته‌های ایجاد شده به یکدیگر ممانعت شود. هم‌چنین ۳ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز هر نمونه را به همراه ۲ میکرولیتر EDTA (نیم مولار) در تیوپ ریخته و طبق برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر قرار دادیم. ابتدا این مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، سپس طی ۶۰ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای، حرارت به ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده شد (۲۰). پس از گذشت مدت زمان لازم برای آماده شدن نمونه‌ها، محصول SSCP و HA مربوط به هر نمونه با هم مخلوط شدند و در کنار نمونه کنترل مثبت بر روی ژل پلی‌آکریل آمید بارگذاری گردیدند و با مدت زمان و ولتاژ مناسب الکتروفورز گشتند (جدول ۲). پس از پایان الکتروفورز، ژل پلی‌آکریل آمید با نیترات نقره رنگ آمیزی

این ژن از نوع جهش‌های بدمعنی می‌باشند که باعث اختلال در تعاملات این پروتئین می‌شوند. در نهایت، این پروتئین می‌تواند عملکرد cMYBP-C را مختل کرده و منجر به هایپرتروفی شود. اما این وضعیت هنوز در بیماران ایرانی با جمعیت‌ها و اقوام مختلف مشخص نگردیده است. در این تحقیق، اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ ژن MYBPC3 که دارای نقش موثری در ساختار پروتئین می‌باشند و همچنین برخی از شایع‌ترین جهش‌ها و نقاط داغ در این اگزون‌ها یافت می‌شوند، مورد بررسی قرار گرفتند. در سال ۱۹۹۵، واتکینز و همکاران اولین جهش در ژن MYBPC3 را گزارش کردند (۲۵). در سال ۱۹۹۸، نیمورا و همکاران در بین بیماران HCM، ۱۲ جهش جدید در ژن MYBPC3 را مشخص کردند که در ارتباط با تولید پروتئین کوتاه شده بود. بیشترین مرگ و میر در این خانواده‌ها به دلیل بیماری قلبی و به طور ناگهانی رخ داده بود (۲۶). در سال ۲۰۰۸، آلکالای و همکاران با یک مطالعه در ایتالیا، حدوداً ۵۰ درصد موارد مربوط به جهش‌های سارکومری را به ژن‌های MYH7 و MYBPC3 مربوط دانسته‌اند (۹). در سال ۲۰۰۹، گارسیا-کاسترو و همکاران در مطالعه‌ای در کشور اسپانیا بر روی بیماران HCM که برای تعیین فراوانی جهش‌ها در ژن‌های سارکومری صورت گرفت، مشاهده کردند که از ۱۲۰ فرد بیمار مبتلا به HCM، ۳۲ نفر دارای جهش بر روی ژن‌های *TPM1*, *TNNT2*, *MYH7* و *MYBPC3* بودند که در بین آن‌ها، ژن *MYBPC3* (۲۰ جهش معادل ۱۶ درصد در ژن *MYBPC3*) بیشترین فراوانی را در جهش‌ها داشت (۲۷). میزان جهش در ژن *MYBPC3* بین ۱۵ تا ۲۴ درصد در کشورهای هلند (۱۸ درصد)، آلمان (۱۹ درصد)، فنلاند (۲۲ درصد)، ژاپن (۲۰ درصد) و اسپانیا (۲۱ درصد) تخمین زده شده است (۲۸). در سال ۲۰۰۴، ریچارد و همکاران با بررسی ۸ ژن (*TNNT2*, *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT1*, *ACTC*, *TPMI*, *MYL3*) و ۱۹۷ بیمار مبتلا به HCM، ۳ حذف در اگزون ۱۵ مشاهده کردند که منجر به تغییر قالب خواندن می‌شد (۲۹). در سال ۲۰۱۳، حیدری و همکاران با مطالعه‌ای بر روی ۳۰ بیمار مبتلا به HCM در



شکل ۲ ب. ژل پلی‌آکریل آمید واکنش SSCP اگزون ۱۸. چاهک‌های شماره ۱ تا ۲۰: نمونه‌های مورد مطالعه. چاهک شماره ۲۱: مارکر. چاهک شماره ۱۸: نمونه کنترل مثبت.

بحث

در این مطالعه، هیچ جهشی در اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ مورد بررسی از ژن MYBPC3 مشاهده نشد. میزان جهش در ژن MYBPC3 بسته به موقعیت جغرافیایی و قومی مناطق، متفاوت گزارش شده است. مثلاً جهش Arg502Trp با فرکانس حدود ۲/۴ درصد، شایع‌ترین جهش در میان افراد اروپایی تبار ایالات متحده آمریکا است. وراثت کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک به صورت اتوزومی غالب همراه با نفوذ متغیر می‌باشد که این بیماری در ۵۰ درصد موارد ارثی است. در سال ۲۰۱۲، سانتوس و همکاران به ۲ جهش اگزون ۱۵ در ۴ فرد از ۷۲ فرد بیمار مورد بررسی پی بردند (۲۱). در سال ۲۰۱۲، دالسی و همکاران با مطالعه‌ای بر روی ۷۷ بیمار پرتغالی مبتلا به HCM، جهش‌های ۵ ژن *MYH7*, *MYBPC3*, *TNN2*, *TNNT13* و *MYL2* را بررسی کردند. ۳۴ جهش مختلف در ۴۱ بیمار (۵۳ درصد) مشاهده شد. ۶۶ درصد از جهش‌ها مربوط به ژن *MYBPC3* بود. از ۲۲ جهش مربوط به *MYBPC3*، ۶ جهش در اگزون ۱۸ اتفاق افتاده بود (۲۲، ۲۳). در سال ۲۰۰۸، تانجور و همکاران اگزون‌های ۱۶، ۱۸، ۱۹، ۲۲، ۲۴، ۲۸، ۳۰، ۳۱ و ۳۴ در ژن *MYBPC3* را در بیماران هندوستان غربال‌گری کردند. نتیجه این غربال‌گری تنها شناسایی یک موتاسیون تغییر چارچوب در اگزون ۱۹ و یک چند شکلی در اگزون ۳۱ بود (۲۴). از شایع‌ترین جهش‌ها که منجر به بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک می‌شود جهش در ژن *MYBPC3* است که این ژن کد کننده پروتئین C متصل شونده به میوزین است. اغلب جهش‌های شناسایی شده در

نامه کارشناسی ارشد و هم‌چنین کارکنان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و کلیه بیمارانی که در انجام این پروژه صمیمانه ما را یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Charron P, Dubourg O, Desnos M, Bouhour J, Isnard R, Hagege A, et al. Diagnostic value of electrocardiography and echocardiography for familial hypertrophic cardiomyopathy in genotyped children. *European Heart Journal*. 1998; 19(9):1377-82.
2. Hershberger RE, Lindenfeld J, Mestroni L, Seidman CE, Taylor MR, Towbin JA. Genetic evaluation of cardiomyopathy—a Heart Failure Society of America practice guideline. *Journal of cardiac failure*. 2009;15(2):83-97.
3. Grothues F, Smith GC, Moon JC, Bellenger NG, Collins P, Klein HU, et al. Comparison of interstudy reproducibility of cardiovascular magnetic resonance with two-dimensional echocardiography in normal subjects and in patients with heart failure or left ventricular hypertrophy. *The American journal of cardiology*. 2002;90(1):29-34.
4. Frey N, Luedde M, Katus HA. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*. 2012;9(2):91-100.
5. Bos JM, Ommen SR, Ackerman MJ. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: one, two, or more diseases? *Current opinion in cardiology*. 2007;22(3):193-9.
6. Thiene G, Corrado D, Basso C. Revisiting definition and classification of cardiomyopathies in the era of molecular medicine. *European Heart Journal*. 2008; 29(2): 144-6.
7. Marian A, Roberts R. Recent advances in the molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 1995;92(5):1336-47.
8. Arad M, Seidman J, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*. 2002;11(20):2499-506.
9. Alcalai R, Seidman JG, Seidman CE. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from

استان چهارمحال و بختیاری، اگزون‌های ۱۲ تا ۱۵ ژن MYH7 را بررسی کردند و به ۲ چند شکلی C>T 5811 و G>A 5845 در اگزون ۱۲ در ۵ بیمار مجزا دست یافتند (۳۰). نتایج مطالعات مذکور با مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد، علت این مسئله می‌تواند تفاوت در ژنتیک جمعیتی مورد مطالعه باشد. با توجه به تفاوت الگوهای جهش بین جمعیت ایرانی و سایر ملیت‌ها، جهش در ژن *MYBPC3* ممکن است در اگزون‌های دیگر اتفاق بیفتند. اغلب مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته به روش SSCP بوده است. دقت این روش ساده، ارزان و حساس بین ۸۰ تا ۸۵ درصد می‌باشد و روشی مناسب برای بررسی جهش‌های موجود در این ژن است (۱۹). هترو دوپلکس به حذف و اضافه شدن بسیار حساس است. در حالی که SSCP برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای بسیار مفید است. بنابراین آنالیز ترکیبی آن‌ها (کاری که ما در این مطالعه انجام دادیم) حساسیت تشخیص را افزایش می‌دهد (۳۱). استفاده از نمونه‌های کنترل مثبت، میزان خطا در نتایج حاصل را به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. از طرف دیگر، استفاده از روش تعیین توالی برای نمونه‌های مشکوک و تأیید آن‌ها جای هیچ‌گونه ابهامی را باقی نمی‌گذارد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، جهش در اگزون‌های ۱۵ و ۱۸ ژن *MYBPC3* نقش به‌سزایی در بیماری‌زایی کاردیومیوپاتی هایپرتروفی جمعیت استان چهارمحال و بختیاری نداشت. در این منطقه، احتمالاً ژن یا لوکوس‌های دیگری در ایجاد HCM دخیل هستند. با این وجود، به منظور تشخیص نقش ژن‌های مختلف و اگزون‌های هر ژن در بیماری، لازم است تا مطالعات بیشتری بر روی سایر اگزون‌ها و نمونه‌های بیشتر صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل تصویب طرح فوق به عنوان پایان

- bench to the clinics. *Journal of cardiovascular electrophysiology*. 2008;19(1):104-10.
10. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Circulation*. 1995;92(4):785-9.
11. Christiaans I, Nannenberg E, Dooijes D, Jongbloed R, Michels M, Postema P, et al. Founder mutations in hypertrophic cardiomyopathy patients in the Netherlands*. Founder mutations in inherited cardiac diseases in the Netherlands: Springer; 2014. p. 37-42.
12. Teirlinck CH, Senni F, El Malti R, Majoor-Krakauer D, Fellmann F, Millat G, et al. A human MYBPC3 mutation appearing about 10 centuries ago results in a hypertrophic cardiomyopathy with delayed onset, moderate evolution but with a risk of sudden death. *BMC medical genetics*. 2012;13(1):105-6.
13. Carrier L, Bonne G, Bahrend E, Yu B, Richard P, Niel F, et al. Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research*. 1997; 80(3): 427-34.
14. Cardim N, Perrot A, Santos S, Morgado P, Padua M, Ferreira S, et al. Hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese population: mutations in the myosin-binding protein C gene. *Revista portuguesa de cardiologia: orgao oficial da Sociedade Portuguesa de Cardiologia= Portuguese journal of cardiology: an official journal of the Portuguese Society of Cardiology*. 2005; 24(12): 1463-76.
15. Saltzman AJ, Mancini-DiNardo D, Li C, Chung WK, Ho CY, Hurst S, et al. Short Communication: The Cardiac Myosin Binding Protein C Arg502Trp Mutation A Common Cause of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation research*. 2010;106(9):1549-52.
16. Harris SP, Lyons RG, Bezold KL. In the thick of it HCM-causing mutations in myosin binding proteins of the thick filament. *Circulation research*. 2011;108(6):751-64.
17. Semsarian C, Group CCGW. Guidelines for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. *Heart, Lung and Circulation*. 2007; 16(1):16-8.
18. Montgomery G, Sise J. Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 1990; 33(3): 437-41.
19. 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*. 2006; 1(6): 3121-8.
20. TahrzadehGharofi M, Farkhoi E, Shirmardi SA, Safari Chaleshtori J, Asadi S, Ghatreh Samani K, et al. DFNB59 gene mutations screening in non syndromic deaf subjects in Chaharmahal va Bakhtiari province. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2010;11(4):76-83.[Persian]
21. Santos S, Marques V, Pires M, Silveira L, Oliveira H, Lança V, et al. High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort. *BMC medical genetics*. 2012;13(1):17-8.
22. Brito D, Miltenberger-Miltenyi G, Pereira SV, Silva D, Diogo AN, Madeira H. Sarcomeric hypertrophic cardiomyopathy: genetic profile in a Portuguese population. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 2012;31(9):577-87.
23. McKenna WJ, Behr ER. Hypertrophic cardiomyopathy: management, risk stratification, and prevention of sudden death. *Heart*. 2002;87(2):169-76.
24. Tanjore RR, Rangaraju A, Kerkar P, Calambur N, Nallari P. MYBPC3 gene variations in hypertrophic cardiomyopathy patients in India. *Canadian Journal of Cardiology*. 2008; 24(2):127-30.
25. Watkins H, Conner D, Thierfelder L, Jarcho JA, MacRae C, McKenna WJ, et al. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nature genetics*. 1995; 11(4): 434-7.
26. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S, Watkins H, Chudley AE, McKenna W, et al. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(18):1248-57.

27. García-Castro M, Coto E, Reguero JR, Berrazueta JR, Álvarez V, Alonso B, et al. Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2009; 62(1):48-56.
28. Lopes LR, Zekavati A, Syrris P, Hubank M, Giambartolomei C, Dalageorgou C, et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *Journal of medical genetics*. 2013; 50(4): 228-39.
29. 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(17): 2227-32.
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 Cardiomyopathy Patients Using PCR-SSCP Technique. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*. 2013; 15(10): 16-20.
31. Konstantinos KV, Panagiotis P, Antonios VT, Agelos P, Argiris NV. PCR-SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases. *Molecular biotechnology*. 2008; 38(2): 155-63.