Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences

Original Article

MYBPC3$^{\Delta 25bp}$ intronic deletion in hypertrophic cardiomyopathy patients and healthy Iranian population

Leila Emrahi[1], Shirin Shahbazi[1*], Mehrnoush Toufan Tabrizi[2], Mohammad Mahdi Mortazavipour[1], Mir Ali Seyyedi[3]

[1]Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Cardiovascular Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[3]Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran
*Corresponding author; E-mail: sh.shahbazi@modares.ac.ir

Received: 10 Jun 2019 Accepted: 14 Jul 2019 First Published online: 17 April 2021
Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):22-28

Abstract

Background: Hypertrophic cardiomyopathy is a common genetic cardiovascular disease with autosomal dominant inheritance and MYBPC3 gene has been frequently linked to its pathogenesis. Since, carriers of the 25 nucleotides deletion located on intron 32 of the MYBPC3 are at increased risk of heart disease we aimed to investigate this variant in hypertrophic cardiomyopathy patients and healthy population.

Methods: DNA was extracted from 350 Blood samples including 42 hypertrophic cardiomyopathies and 308 healthy subjects and the region containing the deletion was amplified by PCR method. PCR products were analyzed on agarose gel and genotyping results were recorded.

Results: Genetic counseling results revealed that 26.2% of patients were sporadic cases vs 59.5% with positive family history and there was a history of sudden cardiac death in the first degree relatives of 42.3% of the patients. Genotyping results showed that all samples had a single band of 198 bp, indicating no MYBPC3$^{\Delta 25bp}$ variant in HCM patients as well as 308 controls. Bioinformatics assessments revealed that MYBPC3$^{\Delta 25bp}$ had a frequency of 0.00438 on Iranome database with the highest incidence reported in the Baloch population.

Conclusion: Since hypertrophic cardiomyopathy is related to sudden cardiac death, population studies in terms of predisposing factors are of particular importance. Our study results showed that MYBPC3$^{\Delta 25bp}$should not be considered as risk factor in the patients of northwest of Iran. However, according to the bioinformatics findings and reports of neighboring countries, it is suggested that MYBPC3$^{\Delta 25bp}$ to be studied in the eastern and southern Iranian hypertrophic cardiomyopathy patients.

Keywords: Hypertrophic Cardiomyopathy, MYBPC3 Gene, Deletion Mutations, Population Study, Bioinformatics

How to cite this article: Emrahi L, Shahbazi Sh, Toufan Tabrizi M, Mortazavipour MM, Seyyedi MA. [MYBPC3Δ25bp intronic deletion in hypertrophic cardiomyopathy patients and healthy Iranian population]. Med J Tabriz Uni Med Sciences. 2021;43(1):22-28. Persian.

© 2021 The Author. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

حذف ۲۵ جفت بازی ژن MYBPC3 در بیماران کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک و جمعیت سالم ایرانی

لیلا امراهی[۱]، شیرین شهبازی[۱*]، مهرنوش طوفان تبریزی[۲]، محمدمهدی مرتضوی پور[۱]، میرعلی سیدی[۳]

[۱]گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۲]مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۳]مرکز تحقیقات پزشکی قانونی، سازمان پزشکی قانونی کشور، تهران، ایران

[*]نویسنده مسؤول؛ ایمیل: sh.shahbazi@modares.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۳ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۱/۲۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛۴۳(۱):۲۲-۲۸

چکیده

زمینه: کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک یک بیماری قلبی‌عروقی شایع ژنتیکی است که منجر به مرگ ناگهانی قلبی در جوانان می‌شود. این بیماری اغلب به صورت اتوزومال غالب به ارث می رسد و ژن MYBPC3 با بیماری مرتبط است. از آنجایی که ناقلین حذف ۲۵ نوکلئوتیدی اینترون ۳۲ ژن MYBPC3 در معرض خطر بالاتری برای بیماری قلبی هستند، در این مطالعه بر آن شدیم تا میزان شیوع این حذف ژنی را در بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک و جمعیت سالم بررسی کنیم.

روش‌کار: ۳۵۰ نمونه خون شامل ۴۲ بیمار کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک از شمال غرب کشور و ۳۰۸ فرد سالم فاقد علایم قلبی از جمعیت های مختلف ایرانی جمع آوری شد. پس از استخراج DNA و با طراحی پرایمرهای مناسب، ناحیه دربرگیرنده حذف با روش PCR و ژل الکتروفورز بررسی و نتایج ژنوتیپینگ ثبت شد.

یافته‌ها: مشاوره ژنتیک نشان داد که ۲۶,۲٪ از بیماران موارد تک گیر و ۵۹,۵٪ موارد خانوادگی هستند و در ۴۲,۳ ٪ از بیماران سابقه مرگ ناگهانی قلبی در افراد درجه یک خانواده وجود داشته است . نتایج ژنوتایپینگ مشخص کرد تمام نمونه ها تنها واجد باند تکی ۱۹۸ جفت باز بوده و هیچ یک از نمونه ها محصول حاصل از حذف یعنی باند ۱۷۳ جفت بازی را نشان ندادند که نشان‌دهنده عدم وجود جهش حذفی در بیماران HCM و همچنین گروه ۳۰۸ نفری افراد کنترل بود. ارزیابی های بیوانفورماتیک مشخص کرد که حذف ۲۵ جفت بازی ژن MYBPC3 روی پایگاه داده ژنوم ایرانیان (Iranome) فرکانس ۰,۰۰۴۳۸ را دارد که بیشترین تعداد بروز در جمعیت بلوچ گزارش شده است.

نتیجه‌گیری: بررسی جمعیت ها از نظر عوامل مستعد کننده کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک به جهت ارتباط با مرگ ناگهانی اهمیت به سزایی دارد . مطالعه ما نشان داد که این جهش در جمعیت بیماران شمال غرب کشور از عوامل خطر محسوب نشده و با توجه به یافته‌های بیوانفورماتیک و مطالعات کشورهای همسایه پیشنهاد می شود در جمعیت های شرقی و جنوبی کشور بررسی شود.

کلید واژه‌ها: کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک، ژن MYBPC3، جهش های حذفی، مطالعه جمعیتی، بیوانفورماتیک

نحوه استناد به این مقاله: امراهی ل، شهبازی ش، طوفان تبریزی م، مرتضوی پور م م، سیدی م ع. حذف ۲۵ جفت بازی ژن MYBPC3 در بیماران کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک و جمعیت سالم ایرانی. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز. ۱۴۰۰؛۴۳(۱):۲۲-۲۸

حق تالیف برای مولف محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر گردیده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک یک بیماری وراثتی قلبی شایع در جهان است که به دلیل عواقب جدی بیماری در جوامع مختلف تحقیق و بررسی متعدد جمعیتی شده است. شیوع بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک در جمعیت عمومی یک به ۵۰۰ بوده و حدود ۱۴,۲۵ میلیون نفر در دنیا متاثر از این بیماری هستند (۱). از آنجایی که بیماری بسیاری از افراد تشخیص داده نمی‌شود و بیماران بدون علامت مشخص قلبی هستند، احتمالا شیوع گزارش شده کمتر از واقعیت باشد (۲) . علایم بالینی بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک بسیار متغیر است و شامل وضعیت کاملا بدون علامت تا مواردی با علایمی همچون بی نظمی ساختاری سلول های قلبی، ضخیم شدن بطن چپ، مسدود شدن خروجی بطن چپ، آریتمی، ظاهر غیر طبیعی دریچه میترال به همراه برگشت خون از آن و در نهایت مرگ ناگهانی است. در اکثر بیماران، هایپرتروفی بطن چپ در زمان بلوغ و در اوایل بزرگسالی (بزرگتر از ۱۷سال) بروز می‌یابد. البته نفوذ وابسته به سن و جنس این بیماری می تواند باعث بروز هایپرتروفی بطن چپ در دهه سوم زندگی یا بعد از آن نیز شود (۳). تحقیقات نشان داده که کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک زمینه ژنتیکی با وراثت اتوزومی غالب دارد که به جهش های مختلفی در ژن های زیر واحد های عضله قلب یا "سارکومرها" نسبت داده می شود. ۱۴ ژن و بیش از ۱۴۰۰ جهش در ارتباط با بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک معرفی شده‌اند که اجزای پروتئینی انقباضی نازک و ضخیم فیلامنت‌های قلبی (سارکومرها) و یا دیسک Z را کد می کنند. شایع ترین ژن های درگیر در این بیماری ژن های MYH7، MYBPC3، TNNT2، و TNNI3 هستند که پروتئین های تولید شده از این ژن ها نقش بسیار مهمی در انقباض سارکومرها دارند (۴). جهش های ژن های MYH7 (زنجیره سنگین بتا میوزین) و MYBPC3 (پروتئین C متصل به میوزین) ۸۰ درصد موارد کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک را تشکیل می دهند. هرگونه تغییر یا کوتاه شدن این پروتئین ها منجر به نقص در عملکرد سارکومرها و نقص در انقباض عضله قلب می شود. البته پیچیدگی و متغیر بودن علایم بالینی این بیماری نشان از نقش ژن های تنظیمی و فاکتور های مختلف محیطی نیز دارد. اکثرجهش های ژن MYBPC3 از نوع بی معنی و جهش‌های ژن MYH7 از نوع بدمعنی هستند (۵). ژن MYBPC3 ، ایزوفرم قلبی پروتئین C متصل به میوزین (cMyBP-C) را کد می‌کند. این ژن به طول ۲۱ کیلوباز روی کرومزوم ۱۱ قرار گرفته و ۳۵ اگزون دارد که ۳۴ اگزون آن کد کننده هستند. cMyBP-C یک پروتئین متصل به فیلامنت ضخیم است که بعنوان قلاب برای سر دمین میوزین عمل کرده و اغلب با اکتین و تیتین ارتباط دارد. این پروتئین هر دو نقش تنظیمی و ساختاری را در سارکومر دارد و از این رو در عملکرد قلب نقش مهمی بازی می‌کند (۶). برای ظاهر شدن علایم جهش های cMyBP-C در مقایسه با جهش های MYH7، به زمان بیشتری نیاز دارند. در نتیجه در میانسالی یا بعد از سن تولید مثل بروز می‌کنند. مشخص شده است که جهش در این ژن مسئول حدود ۴۰ درصد از موارد ژنتیکی بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک است. تاکنون در حدود ۳۴۶ جهش در ژن MYBPC3 گزارش شده است(۹). همانطور که گفته شد جهش های ژن MYBPC3 از نوع بی معنی است، در نتیجه ایجاد واریانت های پروتئینی کوتاه شده محتمل است. این واریانت های کوتاه شده پروتئینی وارد سارکومر نشده و از طریق عدم کفایت هاپلوئیدی (haploinsufficiency) منجر به ایجاد بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک می‌شوند (۷). امروزه مشخص شده که واریانت های پلی مورفیک MYBPC3 نیز می‌توانند با شانس ابتلا به بیماری قلبی مرتبط باشند. یکی از شایع‌ترین جهش‌های مرتبط با بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک که در ابتدا در جنوب آسیا گزارش شد، حذف یک قطعه ۲۵ بازی درون اینترون ۳۲ ژن MYBPC3 ($MYBPC3^{\Delta 25bp}$) است. حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ با طیف وسیعی از پیامد ها از حالت بدون علامت و نرمال قلب گرفته تا عملکرد غیرطبیعی دیاستولیک، هایپرتروفی، انسداد، محدودیت کاردیومیوپاتی با تاکی‌کاردی و اختلال در عملکرد بطن چپ همراه است (۸). این حذف delAGGGAAGCCATCCAGGCTGAGAGGG بوده و به عنوان rs36212066 در پایگاه های داده ژنوم انسان مشخص شده است (۸،۹). وقوع این واریانت باعث ایجاد تغییرات جدی در انتهای C-terminal پروتئین می شود. همانطور که در تصویر ۱ مشخص شده است وقوع این حذف در اینترون ۳۲ منجر به پیرایش تغییر یافته mRNA می شود به صورتی که باعث فرار از اگزون ۳۳ و تغییر چارچوب خواندن در ۶۵ اسیدهای آمینه آخر دامنه C-terminal پروتئین و جایگزینی آنها با ۵۸ اسیدهای آمینه جدید می شود(۹). شیوع این حذف در جنوب آسیا ۴ درصد بوده و تخمین زده شده است که حدود ۵۵ میلیون نفر در این جمعیت ناقل این حذف هستند (۸). از آنجا که این جهش منحصر به جنوب آسیا نیست و در جمعیت های همسایه ایران نیز گزارش شده است و با توجه به اثرات جدی آن ، در این مطالعه بر آن شدیم تا میزان فراوانی این جهش حذفی را در میان بیماران مبتلا به بیماری HCM و همچنین گروه سالم فاقد بیماری قلبی از جمعیت ایرانی را بررسی کنیم.

روش‌کار

مطالعه به صورت مقطعی طراحی و در کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تصویب شد. در این مطالعه ۳۵۰ نمونه بررسی شدند که شامل ۴۲ فرد مبتلا به بیماری

کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک مراجعه کننده به مرکز بیماری های قلبی و عروق شهید مدنی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و ۳۰۸ فرد سالم از قومیت های مختلف ایرانی بودند. از آنجایی که افراد کنترل به‌طور کلی ساکنین استان تهران بودند تفکیک قومیتی آنان امکان‌پذیر نبود چون عموما در چند نسل گذشته ازدواج‌هایی بین اقوام مختلف ایرانی در خانواده های این افراد صورت گرفته بود. حجم نمونه افراد کنترل با توجه به مطالعات قبلی انجام گرفته و بر اساس مقالات مروری انتخاب شد. در خصوص بیماران ، تایید نهایی بیماری با اکوکاردیوگرافی محدودیت هایی برای نمونه گیری ایجاد کرد. به این ترتیب با توجه به فرکانس آللی گزارش شده، پیش بینی شد در بیماران حداکثر ۲ تا ۳ مورد جهش یافت شود. از افراد شرکت کننده رضایت‌نامه اخلاقی اخذ شده و پرسشنامه مبتنی بر سوابق پزشکی و درمانی تکمیل شد. از هر فرد شرکت کننده ۳ میلی لیتر خون وریدی دریافت و در لوله های حاوی آنتی‌کوآگولانت EDTA نگهداری شد. DNA با روش نمک اشباع استخراج شد. ۵۰۰ میکرولیتر از خون محیطی با ۹۰۰ میکرولیتر از محلول لیز سلولی مخلوط شدند و به مدت ۵ دقیقه با 7000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی خارج و بار دیگر یک میلی لیتر از محلول لیز سلولی به رسوب اضافه شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه با 7000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ بار دیگر محلول رویی خارج شده و این بار ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز هسته به رسوب اضافه شد. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. پس از طی زمان انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر NaCl و ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد به محلول اضافه شده و به میکروتیوب محکم ضربه زده شد تا محلولی شیری پدیدار شود. سپس محلول به مدت ۵ دقیقه با 7000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به میکروتیوب جدیدی وارد و ۷۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد به آن اضافه شد. سپس محلول به مدت ۲ دقیقه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از خالی کردن محلول رویی، میکروتیوب در مجاورت هوا خشک شده و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به میکروتیوب ها اضافه شده و DNA استخراجی به حالت محلول درآمد. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ سنجیده شد. DNAهای استخراج شده تا زمان انجام واکنش PCR در دما ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به کمک نرم افزار Primer3 و پایگاه اینترنتی NCBI پرایمرهای اختصاصی برای ناحیه در برگیرنده حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ طراحی شد. توالی پرایمرها و همچنین طول قطعات حاصل از قطعات حاوی حذف و فاقد حذف در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR به صورت معمولی در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با دستگاه ترموسایکر XP Cycler انجام شد. هر میکروتیوب حاوی ۱۰ میکرولیتر مستر میکس x۲ (حاوی MgCl2 ، dNTPs ، آنزیم Taq و بافر PCR ، شرکت آمپلیکون)، ۰٫۵ میکرولیتر از پرایمر فوروارد، ۰٫۵ میکرولیتر از پرایمر معکوس، ۸ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل و ۲ میکرولیتر DNA بود. میکروتیوب ها درون دستگاه ترموسایکر قرار گرفتند و برنامه زیر بر آن ها اعمال شد. ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه. همچنین در انتها یک مرحله تولید نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه بر نمونه ها اعمال شد. ۵ میکرولیتر از محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۷۰ ولت و به مدت ۷۵ دقیقه الکتروفورز شدند. درون ژل از یک میکرولیتر safe stain (شرکت سینا کلون ، ایران) استفاده شده بود. همچنین از ۳ میکرولیتر شاخص مولکولی ۵۰ بازی (ladder) (شرکت سمبیو، تایوان) در کنار نمونه ها استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، از ژل ها با دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد.

یافته‌ها

بیماران از بین موارد تایید شده کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک انتخاب شده و فاقد نسبت خانوادگی با یکدیگر بودند. ۲۳ نفر از بیماران مرد (۵۴٫۸٪) و ۱۹ نفر زن بودند (۴۵٫۲٪). میانگین سنی بیماران ۲۴٫۵ ± ۳۷٫۵ سال بود. برای تمام بیماران معاینات پزشکی و اکوکاردیوگرافی توسط متخصص قلب انجام گرفته و بیماری آنان طبق گایدلاین های موجود تایید شد. اطلاعات استخراج شده از پرسشنامه حاکی از تعدادی مرگ ناگهانی زودرس در بستگان درجه یک بود که البته علل بالینی آن دقیقا مشخص نبود. ۵۷٫۲٪ از بیماران فاقد سابقه و ۴۲٫۳٪ موردی از مرگ ناگهانی زودرس در بستگان درجه اول داشتند. نتایج مشاوره ژنتیک مشخص کرد که ۲۶٫۲٪ از بیماران موارد تک گیر و ۵۹٫۵٪ موارد خانوادگی هستند و در مورد ۱۴٫۳٪ اطلاعات کافی و دقیق بالینی افراد فامیل جهت دسته بندی موجود نبود. جهت بررسی حضور یا عدم حضور حذف ۲۵ جفت بازی، از بررسی روی ژل آگاروز کمک گرفته شد و طول باندهای محصولات حاصل از PCR معمولی ارزیابی شدند. با توجه به مطالعات گذشته این حذف ۲۵ جفت بازی با الکتروفورز روی ژل محصولات PCR قابل مشاهده بود. از این رو تصاویر ژل محصولات PCR بیماران و افراد کنترل بررسی شدند و مشخص شد طول قطعات تمام محصولات ۱۹۸ جفت باز بوده و در هیچ یک از نمونه‌ها محصول حاصل از حذف یعنی باند ۱۷۳ جفت بازی مشاهده نشد (تصویر ۲). این نتایج نشان داد که در هیچ یک از بیماران مبتلا به بیماری HCM و گروه ۳۰۸ نفری افراد کنترل که از نظر فنوتیپی سالم بودند، جهش حذفی مورد نظر رخ نداده است. بررسی پایگاه های داده ژنوم انسانی نشان داد که $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ یا rs36212066 با فرکانس ۰٫۰۰۴۰۶ (۲۴۵۵۶۰/۹۹۶) در پایگاه داده GnomAD ، با فرکانس ۰٫۰۰۰۰۲

(۱۲۵۵۶۸/۳) در پایگاه داده TOPMED ، با فرکانس ۰,۰۰۰۱ (۳۰۹۴۴/۳) در پایگاه داده GnomAD و با فرکانس ۰,۰۰۶ (۵۰۰۸/۳۲) در پایگاه داده G۱۰۰۰ گزارش شده است. این نتایج نشان می دهد که تنوع جمعیتی در شیوع این واریانت بسیار تاثیرگذار بوده و بررسی جوامع مشخص و محدود می تواند به تخمین دقیق شیوع این واریانت کمک کند. بررسی های انجام گرفته روی پایگاه داده ژنوم ایرانیان (Iranome) نشان داد که این واریانت در جمعیت ایرانی فرکانس ۰,۰۰۴۳۸ (۱۵۹۸/۷) را دارد که با گزارشات جهانی مطابق است. همانطور که در جدول ۲ آورده شده، بیشترین تعداد بروز در جمعیت بلوچ گزارش شده است.

تصویر ۱: وقوع حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ در اینترون ۳۲ منجر به پیرایش تغییر یافته mRNA می‌شود به صورتی که باعث فرار از اگزون ۳۳ و تغییر چارچوب خواندن در ۶۵ اسیدهای آمینه آخر دامنه C-terminal پروتئین و جایگزینی آنها با ۵۸ اسیدهای آمینه جدید می شود.

تصویر۲: طول قطعات محصولات ۱۹۸ جفت بازی روی ژل آگاروز در کنار مارکر ۵۰ جفت بازی مشخص است و در هیچ یک از نمونه ها محصول حاصل از حذف یعنی باند ۱۷۳ جفت بازی مشاهده نشد.

جدول۱: توالی پرایمرهای طراحی شده همراه با طول قطعات حاصل (حاوی حذف و فاقد حذف).

پرایمر	توالی	طول محصول فاقد حذف	طول محصول حاوی حذف
مستقیم	'۵-GCTTGCTGAACATGCGGA-3'	۱۹۸	۱۷۳
معکوس	'۵-AGCCTTGGGCATAGTCAGG-3'	جفت باز	جفت باز

جدول۲: میزان شیوع و فرکانس های اللی و ژنوتیپی $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ در جمعیت قومیت های مختلف ایرانی استخراج شده از سایت Iranome

جمعیت	تعداد الل یافت شده	تعداد الل بررسی شده	تعداد هموزیگوت ها	تعداد هتروزیگوت ها	فرکانس ژنوتیپی هتروزیگوت‌ها	فرکانس اللی
بلوچ	۴	۲۰۰	۰	۴	۰/۰۴	۰/۰۲
عرب	۱	۲۰۰	۰	۱	۰/۰۱	۰/۰۰۵
آذری	۱	۲۰۰	۰	۱	۰/۰۱	۰/۰۰۵
جزایر خلیج فارس	۱	۲۰۰	۰	۱	۰/۰۱	۰/۰۰۵
کرد	۰	۲۰۰	۰	۰	۰/۰	۰
لر	۰	۲۰۰	۰	۰	۰/۰	۰
فارس	۰	۲۰۰	۰	۰	۰/۰	۰
ترکمن	۰	۱۹۸	۰	۰	۰/۰	۰
جمع	۷	۱۵۹۸	۰	۷	۰/۰۰۸۷	/۰۰۴۳۸ ۰

بحث

بیماری کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک اغلب با الگوی هایپرتروفی بطن چپ غیراتساعی با درجات مختلفی از اختلال عملکرد دیاستولیک منجر به نارسایی تدریجی قلب و در نهایت مرگ ناگهانی قلب (SCD)، مشخص می شود(۱۰). خطر مرگ ناگهانی قلبی و عوارض آن بر سلامت خانواده و جامعه از موارد مهمی است که باعث شده تحقیقات زیادی به سوی آن معطوف گردد(۱۱). ایزوفرم قلبی MYBPC3 متعلق به ابرخانواده درون سلولی ایمونوگلوبین ها بوده و در عضلات قلبی بیان می شود. این پروتئین جزو پروتئین‌های فیلامنت ضخیم بوده و دارای ۱۱ دمین اصلی C0 تا C10 است که ۸ تا (C0، C1، C2، C3، C4، C5، C8و C10) شبیه دمین های ایمونوگلوبولین بوده و سه تای دیگر (C6، C7 و C9) شبیه دمین های فیبرونکتین نوع III هستند. هر دو عملکرد ساختاری و تنظیمی برای این پروتئین پیشنهاد شده است (۱۲). صدها جهش عامل ایجاد بیماری HCM در این ژن گزارش شده است. تقریبا در دوسوم موارد، این جهش ها در ناحیه پیرایش mRNA رخ می دهد که منجر به ایجاد پروتئین کوتاه شده می شوند و یا جهش درجی یا حذفی رخ می دهد که موجب تغییر چارچوب و ایجاد کدون ختم زودرس می شود(۱۳). علاوه بر جهش های ژنی که به طور مستقیم مسئول ایجاد بیماری شناخته شده‌اند، واریانت های این ژن نیز با فنوتیپ های مختلف بیماری‌های قلبی مرتبط هستند. یکی از این موارد حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ است که با شیوع ۴ درصد در جنوب آسیا مشاهده شده است(۱۴). در مطالعه حاضر با توجه به شواهد، حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ بین گروه‌های بیماران کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک و افراد سالم از جمعیت های مختلف ایرانی بررسی شد. نتایج ما نشان داد که در هیچ‌یک از ۳۵۰ نمونه بررسی شده چه از گروه بیماران چه گروه افراد سالم این حذف وجود ندارد.

این یافته نشان می‌دهد که این تغییر ژنی اگرچه در جنوب آسیا بسیار شایع است و عامل مشکلات قلبی شناخته شده، اما جمعیت ایرانی هم مانند خیلی از جمعیت های اروپایی، تقریبا فاقد این جهش است. مطالعات متعددی قبل از این روی اثرات این تغییر در فنوتیپ های مرتبط با بیماری‌های قلبی انجام گرفته بود. مشخص شده است که این حذف یک مورد کاندید برای تشدید ریسک نقایص قلبی ناشی از کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک و یا انسدادی است(۱۵). این حذف ۲۵ جفت بازی باعث بهم‌ریختگی چارچوب خوانش ترجمه و تولید محصول پروتئینی غیرطبیعی می‌شود که فاقد اگزون ۳۳ است. همچنین شامل قسمت های غیرطبیعی از اگزون ۳۴ و قسمتی از ناحیه غیر ترجمه ای ۳' است. این امر باعث تغییر دومین C10 پروتئین می شود که در نتیجه اتصال cMyBP-C به زنجیره سنگین میوزین مختل شده و انقباض عضله با مشکل مواجه می‌شود(۶،۸). حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ اولین بار در هندوستان و توسط والدمولر و همکاران شناسایی شد. آن ها این حذف را در دو خانواده مشاهده کردند که بصورت هموزیگوت و هتروزیگوت به ارث می‌رسید. طبق بررسی های این گروه شیوع این حذف در دو ایالت کرالا و تامیل‌نادو به ترتیب ۳،۲ درصد و ۳،۸ درصد بود. بررسی این واریانت در ۵۴۰ آلل بررسی شده از جمعیت کشورهای آلمان و روسیه نشان‌دهنده عدم وقوع و شیوع صفر این الل بوده که مطابق با نتایج مطالعه ما است (۱۶). طبق تحقیق دیگری که توسط زانداپانی پی‌اس و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام شد، شیوع حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ در افراد مبتلا به کاردیومیوپاتی در هند ۱۳،۸درصد بود. در این مطالعه ۸۰۰ فرد (۳۵۴ نفر مبتلا به کاردیومیوپاتی و ۲۴۶ نفر کنترل) بررسی شدند که مشخص شد از جمع بیماران، ۴۹ نفر (۱۳،۸درصد) حامل حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ (۴۶ نفر هتروزیگوت و ۳ نفر هموزیگوت) بودند. همچنین از میان افراد کنترل نیز ۷ نفر به صورت هتروزیگوت حذف را به ارث برده بودند. این گروه بررسی دیگری روی ۲۰۸۵ نفر از ۲۶ کشور دنیا انجام دادند و حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ را به صورت هتروزیگوت در جمعیت کشورهای پاکستان، سریلانکا، اندونزی و مالزی مشاهده کردند (۱۵). بررسی دیگری در سال ۲۰۱۰ توسط سیمونسون تی‌اس و همکاران روی ۴۴۷ نفر از ۱۹ جمعیت مختلف (۱۰ جمعیت مربوط به هند و ۹ جمعیت مربوط به کشورهای همسایه) انجام شد. در این بررسی شیوع حذف $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ در هند ۸ درصد بود اما در سایر جوامع هیچ موردی از این حذف مشاهده نشد که مطابق با نتیجه مطالعه ما است (۱۷). در مطالعه اخیری ارتباط $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ و کاردیومیوپاتی هایپرتروفیک دوباره تایید و مشخص شد که بخشی از ناقلین $MYBPC3^{\Delta 25bp}$ واجد جهش D389V هم هستند که بر پیچیدگی تفسیر اثرات این جهش می افزاید (۱۸). در بررسی های که با پایگاه داده Iranome صورت گرفت مشخص شد که این جهش در قومیت بلوچ شیوع بیشتری نسبت به بقیه قومیت های ایرانی دارد (۱۹). در مطالعات کشورهای دیگر بیشتر گزارشات از کشورهای شرقی ایران بوده است. بنابراین بررسی این واریانت در قومیت های شرقی و جنوبی ایران اهمیت خاصی دارد. با توجه به نتایج این مطالعه، پیشنهاد می‌شود که مطالعه مشابه با تعداد نمونه بیشتر در قومیت‌های مختلف ایران جداگانه انجام گیرد و جوامع در خطر شناسایی شوند.

نتیجه‌گیری

مطالعه جوامع در جهت تعیین شیوع و اهمیت واریانت های جمعیتی در استعداد ابتلا به بیماری‌ها نقش مهمی دارند. بیماری کاردیومیوپاتی هیپرتروفیک با توجه به اثرات جبران ناپذیری که بر سلامت و حیات بیماران دارد باید جزو اولویت های این دسته تحقیقات قرار گیرد. مطالعات گسترده روی ژن‌های عامل بیماری و واریانت های آنها می تواند به پزشکان در پیشگیری ، تشخیص و درمان این بیماری قلبی کمک بسیاری کند.

قدردانی

نویسندگان از همه شرکت‌کنندگان در مطالعه و آزمایشگاه بیمارستان بهبود تبریز جهت همکاری در بخش نمونه گیری از بیماران قدردانی می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته پزشکی دانشگاه تربیت مدرس استان تهران به شماره مرجع IR.TMU.REC.1396.616 به تایید رسیده است.

منابع مالی

از این طرح تحقیقاتی تحت شماره گرنت ۲۳۹۰ از طرف موسسه مرکز مطالعات و همکاری های علمی بین‌المللی، CISSC، وزارت علوم تحقیقات وفناوری ایران حمایت مالی شده است.

منافع متقابل

مولفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تالیف و یا انتشار این مقاله ندارند.

مشارکت مولفان

ل ا و ش ش طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را عهده داشتند. همچنین مقاله را تالیف و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند. همکاران در طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه مشارکت داشتند. همچنین نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده اند.

References

1. Shah M. Hypertrophic cardiomyopathy. Cardiol Young. 2017 Jan;27(S1):S25-S30. doi: 10.1017/S1047951116002195. PMID: 28084957.
2. Argulian E, Sherrid MV, Messerli FH. Misconceptions and Facts about Hypertrophic Cardiomyopathy. Am J Med. 2016 Feb;129(2):148-52. doi: 10.1016/j.amjmed.2015. 07.035. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26299316.
3. Jain P, Patel PA, Fabbro M 2nd. Hypertrophic Cardiomyopathy and Left Ventricular Outflow Tract Obstruction: Expecting the Unexpected. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2018 Feb;32(1):467-77. doi: 10.1053/j.jvca.2017.04.054. Epub 2017 May 1. PMID: 28967624.
4. Alejandra Restrepo-Cordoba M, Campuzano O, Ripoll-Vera T, Cobo-Marcos M, Mademont-Soler I, Gámez JM, et al. Usefulness of Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy: an Analysis Using Real-World Data. J Cardiovasc Transl Res. 2017 Feb;10(1):35-46. doi: 10.1007/s12265-017-9730-8.
5. Sabater-Molina M, Pérez-Sánchez I, Hernández Del Rincón JP, Gimeno JR. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A review of current state. Clin Genet. 2018 Jan;93(1):3-14. doi: 10.1111/cge.13027. Epub 2017 Aug 17. PMID: 28369730.
6. Kraker J, Viswanathan SK, Knöll R, Sadayappan S. Recent Advances in the Molecular Genetics of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy in South Asian Descendants. Front Physiol. 2016 Oct 28;7:499. doi: 10.3389/fphys.2016.00499. PMID: 27840609; PMCID: PMC5083855.
7. Maron BJ, Maron MS, Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. J Am Coll Cardiol. 2012 Aug 21;60(8):705-15. doi: 10.1016/j.jacc.2012.0 2.068. Epub 2012 Jul 11. PMID: 22796258.
8. Kuster DW, Sadayappan S. MYBPC3's alternate ending: consequences and therapeutic implications of a highly prevalent 25 bp deletion mutation. Pflugers Arch. 2014 Feb;466(2):207-13. doi: 10.1007/s00424-013-1417-7. Epub 2013 Dec 11. PMID: 24327208; PMCID: PMC3946836.
9. dbSNP. dbSNP rs36212066 2019. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs36212066.
10. Goff ZD, Calkins H. Sudden death related cardiomyopathies - Hypertrophic cardiomyopathy. Prog Cardiovasc Dis. 2019 May-Jun;62(3):212-16. doi: 10.1016/j.pcad.2019.04.001. Epub 2019 Apr 17. PMID: 31004609.
11. Wilcox JE, Hershberger RE. Genetic cardiomyopathies. Curr Opin Cardiol. 2018 May;33(3):354-362. doi: 10.1097/HCO.00000 00000000512. PMID: 29561320.
12. Behrens-Gawlik V, Mearini G, Gedicke-Hornung C, Richard P, Carrier L. MYBPC3 in hypertrophic cardiomyopathy: from mutation identification to RNA-based correction. Pflugers Arch. 2014 Feb;466(2):215-23. doi: 10.1007/ s00424-013-1409-7. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24337823.
13. Salman OF, El-Rayess HM, Abi Khalil C, Nemer G, and Refaat MM. Inherited Cardiomyopathies and the Role of Mutations in Non-coding Regions of the Genome. Front Cardiovasc Med. 2018 June;5(77):1-12. doi: 10.3389/fcvm.2018.00077.
14. Sadayappan S, de Tombe PP. Cardiac myosin binding protein-C: redefining its structure and function. Biophysical reviews. 2012;4(2):93-106. doi: 10.1007/s12551-012-0067-x.
15. Dhandapany PS, Sadayappan S, Xue Y, Powell GT, Rani DS, Nallari P, et al. A common MYBPC3 (cardiac myosin binding protein C) variant associated with cardiomyopathies in South Asia. Nat Genet. 2009 Feb;41(2):187-91. doi: 10.1038/ng.309. Epub 2009 Jan 18. PMID: 19151713; PMCID: PMC2697598.
16. Waldmüller S, Sakthivel S, Saadi AV, Selignow C, Rakesh PG, Golubenko M, et al. Novel deletions in MYH7 and MYBPC3 identified in Indian families with familial hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Cell Cardiol. 2003 Jun;35(6):623-36. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00050-6. PMID: 12788380.
17. Simonson TS, Zhang Y, Huff CD, Xing J, Watkins WS, Witherspoon DJ, et al. Limited distribution of a cardiomyopathy-associated variant in India. Ann Hum Genet. 2010 Mar;74(2):184-8. doi: 10.1111/j.1469-1809.2010.00561.x. Epub 2010 Feb 18. PMID: 20201939; PMCID: PMC2901538.
18. Viswanathan SK, Puckelwartz MJ, Mehta A, Ramachandra CJA, Jagadeesan A, Fritsche-Danielson R, et al. Association of Cardiomyopathy With MYBPC3 D389V and MYBPC3Δ25bpIntronic Deletion in South Asian Descendants. JAMA Cardiol. 2018 Jun 1;3(6):481-8. doi: 10.1001/jamacardio.2018. 0618. PMID: 29641836; PMCID: PMC6054452.
19. Iranome. Iranome Variant 2019. Available from: http://www.iranome.ir/variant/11-47353826-GAGAGGGAGGGAAGCCATCCAGGCT-