بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم پایه

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ژنتیکی ناحیه پروموتری ژن‌های *NFATc1* و *Smad6* با ابتلا به پرولاپس دریچه میترال در بیماران ایرانی

استاد راهنما:

دکتر علی محمد احدی

استاد مشاور:

دکتر هدی آیت

پژوهشگر:

سیده فاطمه حسینی سرونی

اسفند ۱۳۹۲

ابتکارات کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه
متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تقدیر و تشکر

سپاس خدای را که سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند

و سلام و دورد بر محمّد و خاندان پاک او، طاهران معصوم، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است.

با تقدیر و تشکر بی‌کران از استادگرامی‌ام جناب آقای دکتر علی محمد احدی، چرا که بدون راهنمایی‌های ایشان تامین این پایان نامه بسیار مشکل می‌نمود.

با قدر دانی از سرکار خانم دکتر هدی آیت به دلیل یاری و راهنمایی‌های بی‌چشم داشت ایشان که بسیاری از سختی ها را برایم آسانتر نمود.

با قدردانی از دکتر عباسی و جناب آقای احمد احدی که در جمع آوری خون بیماران یاری رساندند.

از کارشناس محترم آزمایشگاه جناب آقای مهندس بنی مهدی نیز کمال قدردانی را دارم.

و با تشکر از دوستان عزیزم که نشانه‌های لطف الهی در زندگی من هستند.

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی،

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در سردترین روزگاران بهترین پشتیبان هستند،

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می کنم.

چکیده

نقص دریچه‌های قلبی در ۲۵ الی ۳۰ درصد کل اختلالات قلبی-عروقی مشاهده می‌شود. پرولاپس دریچه میترال یکی از رایج‌ترین اختلالات دریچه‌ای محسوب می‌شود که شیوع آن در جهان ۴/۲ درصد است. فهم اساس ژنتیکی پرولاپس دریچه میترال برای تشخیص اساس زیستی بیماری ضروری است. ژن‌های *NFATc1* و *Smad6* به تازگی به فهرست ژن‌های دخیل در بروز اختلالات قلبی مادرزادی اضافه شدند و از فاکتورهای نسخه برداری بسیار مهم طی تکوین دریچه محسوب می‌شوند. هدف از این پژوهش مطالعه نواحی پروموتری ژن‌های *NFATc1* و *Smad6* و ارتباط آن با پرولاپس دریچه میترال در بیماران ایرانی است. از ۳۰ فرد بیمار و ۱۰ فرد به عنوان کنترل نمونه خون محیطی پس از انجام مشاوره دقیق و کسب رضایت گرفته شد و DNA کامل گلبول‌های سفید استخراج گردید. نواحی پروموتری ژن-های *Smad6* و *NFATc1* از طریق PCR تکثیر شد. محصولات PCR در بررسی SSCP استفاده شد و مواردی که کنفورمرها شکل فضایی متفاوتی داشتند برای تعیین توالی انتخاب شدند. نتایج تعیین توالی با استفاده از سرور BLAST تجزیه و تحلیل شد. در این بررسی جهش در ناحیه پروموتری ژن‌های *NFATc1* و *Smad6* در بیماران مبتلا به پرولاپس دریچه میترال یافت نشد. ارتباط بین پرولاپس دریچه میترال و جهش در نواحی پروموتری ژن‌های *NFATc1* و *Smad6* ناشناخته است و نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه می‌باشد. لازم به ذکر است که ژن‌های دیگری هم در این بیماران باید مورد بررسی قرار گیرد تا اساس ژنتیکی این بیماری شناسایی شود.

کلمات کلیدی: پرولاپس دریچه میترال، *NFATc1*، *Smad6*، PCR-SSCP

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه **۱**
۱-۱ کلیاتی درباره اختلالات قلبی ۲
۱-۲ عوامل مستعد کننده به اختلالات قلبی ۳
۱-۲-۱ عوامل محیطی ۳
۱-۲-۱-۱ سطح تری گلیسیرید غیرطبیعی ۳
۱-۲-۱-۲ فشار خون بالا ۳
۱-۲-۱-۳ سندرم متابولیک ۴
۱-۲-۱-۴ عدم فعالیت فیزیکی ۴
۱-۲-۱-۵ مصرف مشروبات الکلی ۴
۱-۲-۱-۶ افسردگی، اضطراب و استرس ۴
۱-۲-۲ عوامل ژنتیکی ۴
۱-۲-۲-۱ ساختار کروموزومی غیر طبیعی ۵
۱-۲-۲-۲ جهش در ژن ۵
۱-۲-۲-۳ عدم عملکرد میکرو RNA ۶
۱-۲-۲-۴ اپی ژنتیک ۶
۱-۳ مکانیسم اختلالات قلبی مادرزادی ۷
۱-۴ تکوین قلب ۷
۱-۵ نگاهی بر تکوین دریچه قلب ۹
۱-۶-۱ تنظیم تکثیر سلول های اندوتلیال طی تکوین دریچه توسط مسیر VEGF ۱۰
۱-۶-۱-۱ ارتباط بین کاهش اکسیژن و افزایش قند با تنظیم بیان VEGF در دریچه در حال تکوین ۱۲
۱-۶-۲ ژن *NFATc1* و نقش آن در تنظیم نسخه برداری از لایه اندوکارد قلبی ۱۳
۱-۶-۲-۱ کنترل تکثیر وابسته به NFAT توسط مسیر VEGF ۱۴
۱-۶-۲-۲ ژن *DSCR1* ۱۵
۱-۶-۲-۳ انتشار شیبی Ca^{2+} توسط کانکسین ۱۵
۱-۶-۳ تمایز اندوتلیال به مزانشیم توسط مسیر Notch ۱۶
۱-۶-۴ تنظیم فعالیت برنامه مزانشیمی توسط کمپلکس Wnt/β-catenin ۱۷
۱-۶-۴-۱ همکاری کمپلکس Wnt/β-catenin با VEGF و CD31 ۱۷
۱-۶-۵ تنظیم تمایز اندوتلیال به مزانشیم توسط کمپلکس BMP/TGFβ ۱۸
۱-۶-۵-۱ افزایش انتقال علائم با BMP و نقش ژن Smad6 در هیپوپلاستیک دریچه ها ۱۹
۱-۶-۶ ژن های هدف TGFβ ۲۰
۱-۶-۷ یکپارچه سازی علائم ماتریکس خارج سلولی توسط ErbB ۲۱

عنوان **صفحه**

۱-۶-۸ کنترل EMT توسط کمپلکس NF1/Ras ۲۲
۱-۶-۸-۱ همگرایی نوروفیبرومین و NFATc1 ۲۳
۱-۷ مدل شبکه ای انتقال علائم برای تشکیل و تغییر وضع دریچه قلب ۲۳
۱-۸ پرولاپس دریچه میترال (MVP) ۲۵
۱-۸-۱ انواع پرولاپس دریچه میترال ۲۷
۱-۸-۱-۱ کلاسیک و غیر کلاسیک ۲۷
۱-۸-۱-۲ متقارن و نامتقارن ۲۷
۱-۸-۱-۳ نوسانی و غیر نوسانی ۲۸
۱-۸-۲ تاریخچه بیماری پرولاپس دریچه میترال ۲۸
۱-۸-۳ تشخیص ۲۸
۱-۸-۴ میزان شیوع ۲۹
۱-۸-۵ پاتوفیزیولوژی و فیزیولوژی ۲۹
۱-۸-۶ بیماری MVP و اختلالات بافت پیوندی ۲۹
۱-۸-۷ اساس ژنتیکی پرولاپس دریچه میترال ۳۰
۱-۹ اهداف ۳۲

فصل دوم: مواد و روش‌ها **۳۳**
۲-۱ تجهیزات آزمایشگاهی ۳۴
۲-۲ مواد مصرفی شیمیایی و بیولوژیکی ۳۵
۲-۲-۱ سایر مواد وسایل مورد استفاده ۳۶
۲-۳ انتخاب بیماران مبتلا به پرولاپس دریچه میترال ۳۶
۲-۴استخراج DNA ژنومی ۳۷
۲-۴-۱ روش استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم از خون ۳۷
۲-۴-۲ بررسی کمیت و کیفیت استخراج DNA ۳۸
۲-۴-۲-۱ روش اسپکتروفتومتری ۳۸
۲-۴-۲-۲ روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۳۸
۲-۴-۲-۳ بافرهای مورد نیاز جهت تهیه ژل آگارز ۳۹
۲-۴-۲-۴ طرز تهیه ژل آگارز یک درصد و رنگ آمیزی آن ۳۹
۲-۴-۲-۵ بررسی نتایج الکتروفورز ۴۰
۲-۵ انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) ۴۰
۲-۵-۱ طراحی پرایمر ۴۱
۲-۵-۲ مواد مورد نیاز و مقدار آن در یک واکنش استاندارد PCR ۴۱

عنوان **صفحه**

۲-۵-۳ تایید وجود محصول PCR به وسیله ژل آگارز ۴۳
۲-۶ تکنیک چند شکلی فضایی قطعات تک رشته ای (SSCP) ۴۳
۲-۶-۱ عوامل موثر بر SSCP ۴۳
۲-۶-۲ مواد مورد استفاده در SSCP ۴۴
۲-۶-۳ مراحل SSCP ۴۵
۲-۶-۴ تهیه ژل آکریل آمید ۱۰ درصد و انجام SSCP ۴۵
۲-۶-۵ مواد مورد نیاز جهت رنگ آمیزی ژل آکریل آمید به روش نیترات نقره ۴۶
۲-۶-۶ رنگ آمیزی ژل آکریل آمید به روش نیترات نقره ۴۶
۲-۶-۷ تفسیر نتایج SSCP ۴۷
۲-۷ تعیین توالی ۴۷
۲-۷-۱ بررسی تعیین توالی ۴۷

فصل سوم: نتایج **۴۸**
۳-۱ استخراج DNA ژنومی و تعیین کیفیت و کمیت آن ۴۹
۳-۲ نتایج PCR برای نواحی پروموتری *NFATc1* و *Smad6* ۵۰
۳-۳ بررسی پلی مورفیسم ساختار فضایی قطعات تک زنجیره(SSCP) ۵۱

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری **۵۶**
۴-۱ نتیجه گیری کلی ۵۷
۴-۲ بررسی پلی مورفیسم در پروموتر ژنهای *NFATc1* و *Smad6* ۵۸
۴-۳ پیشنهادات ۶۱

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱: مدلی از همکاری ژن های متعدد طی تکوین قلب ۹
شکل۱-۲: نگاه کلی بر تکوین دریچه قلب ۱۰
شکل ۱-۳: مدلی برای VEGF در کنترل تکثیر سلولهای اندوتلیال دریچه قلب ۱۲
شکل ۱-۴: مدل برای NFATc1 به عنوان یک تنظیم کننده نسخه برداری از سلول های اندوتلیال ۱۶
شکل ۱-۵: مدل برای Notch دخیل در فرآیند تمایز اندوتلیال به مزانشیم ۱۷
شکل ۱-۶: مدلی برای BMP/TGFβ در شروع EMT ۲۱
شکل ۱-۷ : مدلی از اطلاع رسانی توسط ErbB در یک پارچه سازی علائم ماتریکس خارج سلولی ۲۲
شکل ۱-۸: مدلی برای NF1 در کنترل مهار برگشتی EMT ۲۳
شکل ۱-۹: مدل شبکه اطلاع رسانی برای تغییر وضع وتکوین دریچه قلب ۲۵
شکل۱-۱۰: مشاهده تفاوت دریچه میترال در بیماران مبتلا به پرولاپس و افراد سالم ۲۶
شکل ۱-۱۱: آناتومی دریچه میترال ۲۶
شکل۳-۱: نمونه الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد، استخراج DNA. ۵۰
شکل ۳-۲: نمونه الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد، بررسی محصولات PCR قطعه ۱۸۰ جفت بازی مربوط به ناحیه پروموتری ژن *NFATc1* ۵۰
شکل ۳-۳: نمونه ژل آگارز ۱ درصد، بررسی محصولات PCR قطعه ۲۴۰ جفت بازی مربوط به ناحیه پروموتری ژن *Smad6* ۵۱
شکل ۳-۴: نمونه ای از ژل SSCP مربوط به ناحیه پروموتری ژن *NFATc1* ۵۲
شکل ۳-۵: نمونه ای از ژل SSCP مربوط به ناحیه پروموتری ژن *NFATc1* ۵۲
شکل ۳-۶:نمونه ای از ژل SSCP مربوط به ناحیه پروموتری ژن *NFATc1* ۵۳
شکل ۳-۷: نمونه ای از ژل SSCP مربوط به ناحیه پروموتری ژن .*NFATc1* ۵۳
شکل۳-۸ :نمونه ای از ژل SSCP مربوط به ناحیه پروموتری ژن *Smad6* ۵۴
شکل۳-۹: نمونه ای از ژل SSCP مربوط به ناحیه پروموتری ژن *Smad6* ۵۴
شکل ۳-۱۰: کروماتوگرام مربوط به تعیین توالی ژن *NFATc1* ۵۵
شکل ۳-۱۱: نتیجه BLAST تعیین توالی ژن *NFATc1* ۵۵

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱: لیست دستگاه ها و لوازم مورد استفاده ۳۴
جدول ۲-۲: لیست مواد مصرفی شیمیایی و بیولوژیکی ۳۵
جدول ۲-۳: مواد مورد نیاز جهت تهیه بافر لیز ۳۷
جدول ۲-۴: لیست پرایمرهای طراحی شده برای نواحی پروموتری *NFATc1* و *Smad6* ۴۱
جدول۲-۵: نوع و مقدار ماده مصرفی برای تهیه ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش جهت انجام یک واکنش PCR ۴۲
جدول ۲- ۶: برنامه دمایی برای ناحیه پروموتری ژن *NFATc1* ۴۲
جدول ۲- ۷: برنامه دمایی برای ناحیه پروموتری ژن *Smad6* ۴۲

پیوست ها

عنوان **صفحه**

پیوست۱: فرم پرسش نامه بیماران ۶۳
پیوست۲: توالی ناحیه پروموتری ژن *NFATc1* و پرایمرهای مربوط به آن ۶۴
پیوست۳: توالی ناحیه پروموتری ژن Smad6 و پرایمرهای مربوط به آن ۶۵

فصل اول

مقدمه و مروری بر تحقیقات گذشته

فصل اول

مقدمه و مروری بر منابع گذشته

۱-۱ کلیاتی درباره اختلالات قلبی

امروزه اختلالات قلبی عروقی یکی از رایج‌ترین اختلالات چند علتی[1] می‌باشند که بروز آن ۴ تا ۶ در هر ۱۰۰۰ نوزاد است. این اختلالات یکی از عوامل غیرعفونی مرگ در سال‌های اولیه زندگی محسوب می‌شوند. نقص دریچه-های قلبی و ساختارهای مربوط به آن در ۲۵ الی ۳۰ درصد کل اختلالات قلبی عروقی مشاهده می‌شود. اختلالات دریچه‌ای مادرزادی در بین بیماری‌های دریچه‌ای فراوان‌تر است. در بزرگسالان بیماری‌های دریچه قلبی دلیل اصلی مرگ و میر به شمار می‌آیند که جهت درمان آن از روش ترمیم دریچه یا جابجایی دریچه استفاده می‌شود. از روش‌های احتمالی درمان برای بیماری‌های دریچه قلبی بزرگسالان می‌توان به افزایش مسیر ترمیم درونی یا استفاده از سلول‌های اجدادی یا پیشرو[2] جهت مهندسی بافت دریچه‌های قلبی نام برد. با فهم مولکولی بیشتر از کنترل تکوین دریچه قلب می‌توان به راهکارهای جدید درمانی پی برد [۱].

1 - Multi factorial
2 - Progenitor

اختلالات تکوینی در عملکرد و ساختار دریچه در چندین سندروم که دارای ریشه ژنتیکی هستند نیز اتفاق می‌افتد. از جمله این سندروم‌ها می‌توان به تریزومی[1] ۲۱، سندروم نونان[2]، سندروم مارفان[3]، سندروم ویلیامز و سندروم هولت اورام[4] اشاره کرد. علاوه بر این جهش در ژن‌های ویژه با اختلالات تکوینی و بیماری‌های مربوط به دریچه قلب مرتبط هستند. هر چند در موارد زیادی دلیل اصلی اختلالات تکوینی دریچه و عدم عملکرد دریچه به خوبی شناخته نشده است [۲].

۱-۲ عوامل مستعد کننده به اختلالات قلبی

اختلالات قلبی مادرزادی (CHD)[5] بیماری‌های چند عاملی هستند که فاکتورهای محیطی و ژنتیکی مهمی در بروز آن نقش دارند [۲]. در ادامه به تفسیر هر یک می‌پردازیم.

۱-۲-۱ عوامل محیطی

مشخص شده که فاکتورهای محیطی طی تکوین جنینی خطر ابتلا به CHD را افزایش می‌دهند. از جمله این فاکتورهای محیطی می‌توان به مواردی همچون: عفونت‌های ویروسی مثل سرخجه، قرارگیری در معرض تراتوژن‌های شیمیایی همانند: رتینوئیک اسید، لیتیم، دیلانتین، هیدروکربن‌های هالوژن شده و بیماری‌های مادرزادی همچون دیابت اشاره کرد [۳-۶].

۱-۲-۱-۱ سطح تری‌گلیسیرید غیرطبیعی

کلسترول و تری‌گلیسیریدها انواع مختلفی از چربی‌ها هستندکه در خون و قسمت‌های مختلف بدن یافت می‌شوند. این ترکیبات در خون توسط لیپوپروتئین‌ها حمل می‌شوند. بدن ما برای عملکرد موثر خود نیاز به میزان کمی از این ترکیبات دارد اما میزان زیاد آن منجر به تشکیل پلاک در دیواره سرخرگ‌ها می‌شود. در واقع پلاک‌ها عمدتا کلسترول بدون استفاده هستند [۷].

۱-۲-۱-۲ فشار خون بالا

فشار خون در واقع نیرویی است که خون به دیواره سرخرگ‌ها وارد می‌کند. فشار خون زمانی بالاست که قلب خون را به درون سرخرگ‌ها پمپاژ می‌کند که به آن فشار سیستولیک می‌گویند و پایین‌ترین میزان فشار خون بین ضربان قلب است که در این حالت قلب در حالت استراحت خود به سر می‌برد. در طول روز میزان فشار خون متغیر است اما اگر میزان آن بالاتر از حالت طبیعی کل زمان باشد در این حالت فشار خون نام می‌گیرد. به فشار

1 - Trisomy 21
2 - Noonan Syndrome
3 - Marfan Syndrome
4 - Holt Oram Syndrome
5 - Congenital Heart Disease

خون بالا کشنده خاموش نیز گفته می‌شود چون بدون علامت بوده و طی چندین سال باعث آسیب به دیواره سرخرگ‌ها شده و در نهایت باعث آرترواسکلروزیس[1] می‌شود [۷].

۱-۲-۱-۳ سندرم متابولیک

ابتلا به سندرم متابولیک خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی را تا دو برابر افزایش می‌دهد [۷].

۱-۲-۱-۴ عدم فعالیت فیزیکی

عدم فعالیت فیزیکی خطر ابتلا به بیماری قلبی را افزایش می‌دهد. حتی اگر فرد هیچ علائمی از بیماری-های قلبی نداشته باشد. عدم فعالیت فیزیکی می‌تواند خطر ابتلا به دیابت، فشار خون بالا و افزایش وزن را نیز سبب شود [۷].

۱-۲-۱-۵ مصرف مشروبات الکلی

مشروبات الکلی می‌تواند باعث آسیب به ماهیچه‌های قلبی و در نهایت منجر به درماندگی قلبی[2] شود. مصرف مشروبات همچنین می‌تواند خطر ابتلا به سرطان همچون سرطان سینه را نیز افزایش دهد [۷].

۱-۲-۱-۶ افسردگی، اضطراب و استرس

احساسات منفی همچون افسردگی، اضطراب و عصبانیت احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی کشنده را افزایش می‌دهند. در واقع این احساسات منفی منجر به یکسری رفتارهایی می‌شود که سلامتی قلب را به خطر می‌اندازد. این رفتارها شامل: سیگار کشیدن، نوشیدن مشروبات و مصرف مواد غذایی با چربی بالاست [۷].

۱-۲-۲ عوامل ژنتیکی

پیشرفت‌های شگرفی در ژنتیک مولکولی و زیست تکوینی حاصل شده است که نتیجه بکارگیری. تکنیک‌های رایج ژنتیکی برای ارزیابی اختلالات قلبی مادرزادی است که شامل: روش‌های سیتوژنتیکی، FISH[3] و بررسی جهش درDNA است. بیشتر روش‌ها بر اساس PCR است که به میزان زیادی استفاده می‌شود. البته روش گران قیمت تعیین توالی اگزون به اگزون DNA ژنومی هم قابل انجام است [۸].

1 - Atherosclerosis
2 - Heart failure
3 - Fluorescent In Situ Hybridization

فرآیند پیچیده شکل‌گیری قلب توسط شبکه‌ای از مسیرهای ژنتیکی بسیار حفاظت شده کنترل می‌شود. منشا CHDها می‌تواند متفاوت باشد که شامل: ساختار کروموزومی غیر طبیعی، جهش در ژن، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی، RNA غیر طبیعی و عوامل اپی‌ژنتیک هستند [۸].

۱-۲-۲-۱ ساختار کروموزومی غیر طبیعی

از شایع‌ترین اختلالات کروموزومی: مضاعف شدن[۱]، جابجایی و حذف ها که عمدتا حذف های ریز[۲] هستند را می‌توان اشاره کرد. برای مثال: حذف ریز در 22q11 باعث بروز سندروم دی‌جورج[۳] می‌شود که یکی از برجسته‌ترین ویژگی این بیماران از هم گسیخته شدن کمان آئورتی است [۹]. همچنین مضاعف شدن در 21q22 باعث بروز اختلالات قلبی مادرزادی در مبتلایان به سندروم داون می‌شود [۱۰]. جابجایی ازنوع Trance version که باعث تبدیل سیتوزین به آدنین در ژن *NKX2.5* می‌شود، باعث بروز اختلال در تیغه جدا کننده دهلیزها می‌شود [۱۱].

۱-۲-۲-۲ جهش در ژن

بسیاری از فاکتورهای ژنتیکی درگیر در سندروم‌های ژنتیکی و CHDهای خانوادگی شناخته شده است. اما اساس ژنتیکی اکثر CHDهای تک‌گیر[۴] ناشناخته مانده است. با وجود پیشرفت‌های شگرفی که در ژنتیک مولکولی و زیست تکوینی انجام شده، با این حال بسیاری از ژن‌های مرتبط با تکوین قلب ناشناخته باقی مانده است. تعدادی از اختلالات قلبی و سندروم‌های ژنتیکی قلبی با جهش در انواع متعددی ار ژن‌های منفرد درگیر هستند و ثابت شده که این جهش‌ها باعث تغییر در ساختار و یا تغییر در عملکرد پروتئین حاصل از ژن می‌شود [۱۲]، از جمله این ژن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

ژن *NkX2.5*: یک ژن بسیار ضروری جهت تنظیم بیان ژن مربوط به بافت‌های خاص بوده که برای تمایز بافت ضروری است. جهش در آن باعث عدم تشکیل قلب در دوران جنینی، اختلال دیواره دهلیزی و تاخیر در جریان خون دهلیزی و بطنی می‌شود [۱۳].

ژن *PTPN11*[۵]: یک پروتئین تیروزین فسفات به نام SH2[۶] را کد می‌کند که نقش مهمی در انتقال علائم در انواع متفاوتی از فرآیندهای زیستی مانند تشکیل هلال دریچه دارد و جهش در این ژن در ۴۰ تا ۵۰ درصد

1 - Duplication
2 - Micro deletion
3 - Digeorge syndrome
4 - Sporadic
5 - Protein Tyrosine Phosphatase Non receptor 11
6 - Src Homology 2

بیماران با سندروم نونان مشاهده می‌شود. در ۸۰ الی ۹۰ درصد افراد با سندروم نونان اختلالات قلبی متفاوتی همچون تنگی دریچه ریوی، اختلالات دیواره دهلیزی و بطنی و اختلالات دریچه میترال مشاهده می‌شود [۱۴].

ژن *CFC1*[1]: این ژن نقش مهمی در مسیر انتقال علائم بین‌سلولی طی تشکیل جنین مهره‌داران دارد. این پروتئین در عدم تقارن چپ و راست طی تکوین اندام درگیر است. جهش در این ژن باعث بیماری به نام DORV[2] می‌شود که اندازه بطن راست در این بیماران دو برابر حالت طبیعی است [۱۵].

ژن *GATA4*[3]: این ژن عضوی از خانواده GATA است که یک فاکتور نسخه برداری دارای قلمرو انگشت روی[4] می‌باشد. جهش در این ژن باعث اختلال یا نقص در تکوین تیغه[5] قلبی می‌شود [۱۶].

۱-۲-۲-۳ عدم عملکرد میکرو RNA

میکروRNAها مولکول‌های کوچک، طبیعی، تک رشته و غیر کد کننده هستند که بیان ژن را از طریق اتصال به mRNA هدف تنظیم می‌کنند و باعث مهار ترجمه یا شروع تجزیه آن می‌شود. با وجود این که نقش‌های اختصاصی بسیاری از میکرو RNA شناخته نشده است اما ویژگی‌های عملکردی تعداد کمی از آن‌ها نشان می-دهند که این مولکول‌های کوچک در مسیرهای تکوینی و فیزیولوژی درگیر هستند [۱۷, ۱۸]. به عنوان مثال:miR1 و miR133 تکوین ماهیچه‌های اسکلتی و قلب را کنترل می‌کنند. همچنین مشخص شده که miR1 هدف فاکتور نسخه‌برداری HAND2[6] است و حذف ژن آن باعث اختلالات قلبی شامل نقص دیواره بطنی[7]، نقص در رسانایی مواد مورد نیاز عضله قلبی و افزایش تکثیر سلول‌های عضله قلب می‌شود [۱۹, ۲۰].

۱-۲-۲-۴ اپی ژنتیک

اصطلاح اپی‌ژنتیک در واقع به ژنتیک مرسوم بیرون معنی[8] می‌شود و به مطالعه تغییرات پایدار در بیان ژن می‌پردازد کی طی تکوین و تکثیر سلول رخ می‌دهد. اپی‌ژنتیک نقش مهمی در تنظیم عملکردهای متفاوت ژنومی ایفا می‌کند و تمایز سلول و ریخت‌زایی جنین را تنظیم می‌کند [۲۱]. BAF60C یک زیر واحد از کمپلکس تغییر حالت دهنده کروماتین[9]، مشابه با کمپلکس SWI/SNF، به نام BAF است که به طور فیزیکی باعث اتصال فاکتورهای نسخه برداری قلبی به کمپلکس BAF می‌شود. حذف این زیر واحد باعث اختلال در ریخت‌زایی قلب و

1 - Cripto FRL-1 Cryptic family 1
2 - Double Outlet Right Ventricle
3 - GATA binding protein 4
4 - Zinc finger
5 - Septum
6 - Heart And Neural crest Derivatives expressed 2
7 - Ventricular Septal Defect
8 - Outside conventional epigenetics
9 - Choromatin remodeling

عدم عملکرد زیر مجموعه‌هایی از ژن‌های درگیر در تکوین قلب می‌شود. SMYD1 که یک هیستون متیل ترانسفراز محدود به ماهیچه است و به عنوان یک تنظیم کننده مهم جهت رشد محفظه‌های قلبی و تمایز عمل می‌کند. هیستون داستیلازها هم نقش مهمی در افزایش هایپرتروفی و تکوین قلب دارند [۲۲, ۲۳].

۱-۳ مکانیسم اختلالات قلبی مادرزادی

فنوتیپ‌های CHD بسیار متفاوت هستند. از نقص دیواره دهلیزی[1] و دیواره بطنی غیر قابل تشخیص در زندگی تا نقص دیواره دهلیزی بطنی با علائم بسیار برجسته در زندگی را می‌توان ذکر نمود. اثبات شده که چند شکلی تک نوکلئوتیدی یا میانکنش ژن‌های کلیدی با فاکتورهای محیطی باعث اختلال در تکوین طبیعی قلب می‌شود که حاصل آن اختلالات قلبی متفاوت هستند [۲۴]. علت اختلالات قلبی و عروقی مادرزادی در شش دسته تقسیم بندی می‌شوند:

۱. اختلال در مهاجرت بافت سطحی مزانشیم که باعث اختلال در کمان یا قوس آئورت می‌شود.

۲. اختلالات جریان خون درون قلبی که باعث اختلالات دیواره‌ای و اختلالات مسدود کننده چپ و راست قلب می‌شود.

۳. اختلالات ماتریکس خارج سلولی که باعث نقص در کانال دهلیزی و بطنی می‌شود.

۴. اختلالات مربوط به رشد عضله‌های قلبی که باعث اختلالات در سیاهرگ ریوی می‌شود.

۵. اختلالات موضعی و لوپ‌ها که باعث اختلال در موقعیت چپ و راست قلب می‌شود [۲۴].

۱-۴ تکوین قلب

تکوین قلب توسط یک شبکه بسیار حفاظت شده‌ای از فاکتورهای نسخه‌برداری که مسیرهای انتقال علائم را به هم متصل می‌کنند، کنترل می‌شود. شبکه مرکزی فاکتورهای نسخه برداری شامل: MEF2، GATA، TBX، NKX2.5، HAND است. ۱۲ عدد از فاکتورهای نسخه‌برداری مرتبط با تشکیل قلب در بسیاری از موارد به عنوان فاکتورهای همکاری کننده برای این مرکز تنظیم کننده هستند. خود تنظیمی و تنظیم کنندگی بینابینی شبکه ژن‌های قلبی زمانی باعث حفظ فنوتیپ‌های قلبی می‌شود که توسط علائم القایی بالادست فعال شود (شکل ۱-۱) [۲۵-۲۷].

در انسان تکوین قلب در روز ۱۵ تا ۱۶ دوران بارداری با مهاجرت سلول‌های بنیادی پیش قلبی[2] شروع می‌شود و در ۵ مرحله قلب تشکیل می‌شود:

1 - Atrial Septal Defect
2 - Precardiac

۱. مهاجرت سلول‌های پیش قلبی از خط استوایی و جمع شدن قلب هلالی شکل جفتی در صفحه میوکارد

۲. به هم‌آمیختگی هلال‌های قلبی و تشکیل لوله قلبی اولیه و ایجاد یک قلب مشخص

۳. تشکیل لوپ قلب[1] که تنظیم محفظه‌های قلبی آینده را تضمین می‌کند.

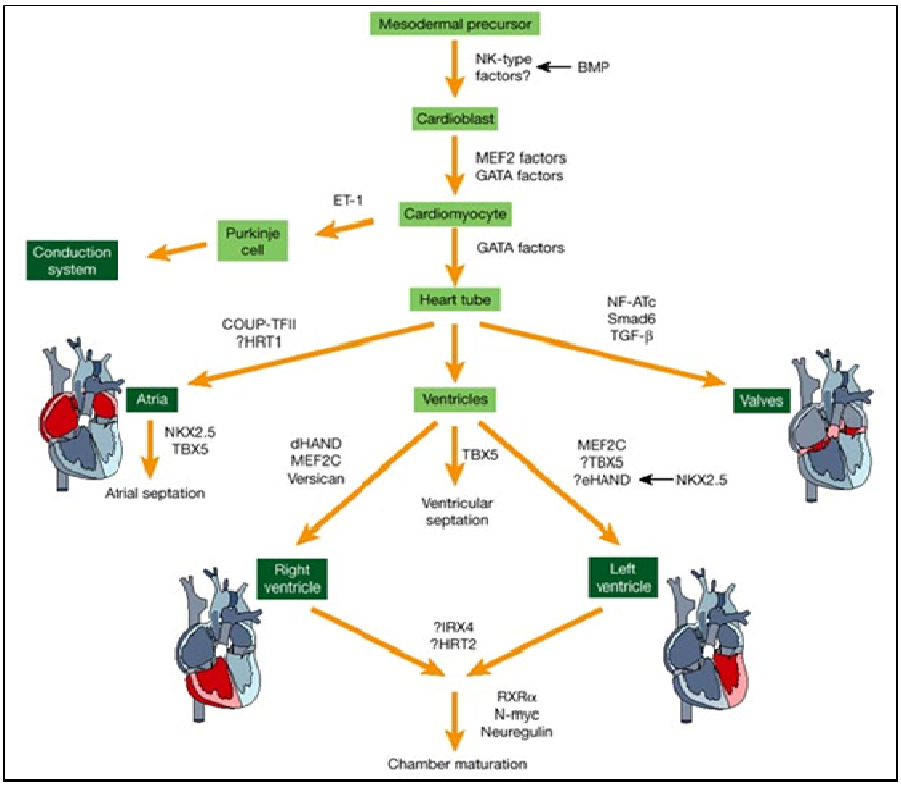
۴. تشکیل جداره‌ها، تیغه‌ها و محفظه‌های قلبی

۵. تکوین سیستم جریانی قلب و عروق [۲۵-۲۷]

ایجاد عدم تقارن چپ و راست برای تکوین طبیعی قلب ضروری است. مسیرهایFGF[2]، BMP[3]، Nodal و Wnt به عنوان علائم درونی تشکیل قلب متقارن عمل می‌کنند. مسیرهای Shh/Ihh[4]، BMP2، FGF8 و Nodal به عنوان تنظیم کننده‌های مثبت هستند در حالی که مسیر Wnt به عنوان تنظیم کننده منفی عمل می‌کند. ژن-های *TBX5*، *GATA4*، *SRF*[5]، *NKX2.5* و *HAND2* یک شبکه تنظیم مرکزی را تشکیل می‌دهند که در ریخت-زایی، تشکیل و کنترل لوپ‌های قلبی، تقارن چپ و راست و تشکیل محفظه‌های قلبی دخیل هستند. ژن*SRF* هم باعث تنظیم تمایز سلول‌های ماهیچه صاف رگ‌های قلبی می‌شود [۲۷-۳۰].

ژن‌هایی که در تکوین قسمت خارجی عضله قلب یا اپی‌کارد درگیر هستند شامل: *FOG2*[6]، اینتگرین‌ها، اریتروپویتین‌ها و رسپتور اریتروپویتین هستند. ژن‌های خاصی همانند رسپتور *Notch*، *JAG*، *Wnt*، *TGFβ2* و *BMP*ها در تکوین تاج عصبی[7] قلب درگیر هستند. مسیر انتقال علائم رتینوئیک اسید در تنظیم تشکیل لوپ قلب درگیر است. البته مسیرهای انتقال علائم پیچیده‌ای بین اندوکارد و میوکارد برقرار است تا باعث تشکیل لایه اندوکارد و دریچه‌های قلبی شود که شامل مسیرهای: Wnt/β-catenin، Notch، NFATc1، VEGF، erbB، EGF، BMP/TGFβ و NF1[8] است [۳۱-۳۳].

1 - Cardiac looping
2 - Fibroblast Growth Factor
3 - Bone Morphogenetic Protein
4 - Sonoc Hedgehog Homology/Indian Hedgehog Homolog
5 - Serum Response Factor
6 - Friend Of Gata2
7 - Neural crest
8 - Neuro Fibromin1



شکل ۱-۱: مدلی از همکاری ژن‌های متعدد طی تکوین قلب. این نما مراحل ویژه‌ای را که در ریخت‌زایی قلب درگیر است را نشان می‌دهد. تشکیل دریچه‌ها، بطن‌ها، دهلیزها و سیستم‌های هدایتی تحت کنترل گروهی از پروتئین‌های تنظیمی هستند که به طور مستقل یا مشترک عمل می‌کنند [۳۲].

۱-۵ نگاهی بر تکوین دریچه قلب

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های شگرفی در مورد تعیین مسیرهای تنظیمی که باعث کنترل تکوین طبیعی و غیرطبیعی دریچه‌های قلبی می‌شود انجام شده است. سلسله مراتب تنظیمی شامل انواع متفاوتی از مسیرهای اطلاع رسانی، فاکتورهای نسخه‌برداری و ژن‌های تنظیمی پایین دست است که طی تشکیل دریچه در مهره‌داران حفظ شده است. مسیرهای تنظیمی پیچیده‌ای جهت تشکیل لایه اندوکارد، تکثیر سلول‌های پیش‌ساز دریچه، تکوین رده سلولی دریچه و ایجاد ماتریکس خارج سلولی در لخت‌های اولیه دریچه ضروری است. مدارک زیادی وجود دارد مبنی بر این که مکانیسم تنظیمی برای تکوین دریچه طبیعی و نیز اختلالات دریچه‌ای حاکم است [۳۴]. لوله قلب متشکل از لایه میانی میوکارد و سلول‌های اندوکارد لایه داخلی است که توسط ماتریکس خارج سلولی (ECM)[1] از هم جدا شده‌اند. البته ماتریکس خارج سلولی را به عنوان ژله قلبی[2] هم یاد می‌کنند. یک زیر مجموعه‌ای از سلول‌های اندوتلیال، چند لایه و سپس ورقه ورقه شده و در نهایت

1 - Extra Cellular Matrix
2 - Cardiac jelly