

بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن های RAN (rs 14035) و XPO5 (rs 2257082) با سقط مکرر در زنان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در سال های ۱۳۹۵-۱۳۹۶

نگین توحیدی^۱، سعید قربان^۲

دریافت مقاله: ۹۶/۷/۲۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۶/۱۰/۲۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۱/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۷/۱/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مولکول های مهم در سلول های تروفوبلاستی جفت، پروتئین *XPO5* (rs 2257082) است که در بیوژنز و پردازش miRNA نقش دارد. از پروتئین های دیگری که در فرآیند پردازشی و تکاملی miRNAها نقش دارند، RAN است. وجود ژن های *RAN* (rs 14035) و *XPO5* ممکن است بر تنظیم بیان ژن ها در رحم مادر اثرگذار باشد و موجب خطر سقط های مکرر شود. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن های rs 14035 و rs 2257082 با سقط مکرر در زنان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در سال های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ بود.

مواد و روش ها: این مطالعه توصیفی بر روی ۱۰۰ خانم مبتلا به سقط مکرر با عامل ناشناخته و ۱۰۰ خانم بدون سابقه سقط و واجد یک فرزند زنده مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در طی سال های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ انجام شد. بعد از استخراج DNA، با روش PCR-RFLP فراوانی این چندشکلی ها مورد ارزیابی قرار گرفت و داده ها با آزمون آماری مجذور کای، تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: ارتباط معنی داری بین ژنوتیپ های CC/CT+TT و CT/CC+TT در چندشکلی ژن *XPO5* با خطر سقط مشاهده شد ($P=0/041$). این در حالی است که فراوانی ژنوتیپ ها برای چندشکلی ژن *RAN*، اختلاف معنی داری را از نظر آماری بین دو گروه زنان نشان نداد ($P=0/516$).

نتیجه گیری: یافته ها نشان داد که چندشکلی ژن *XPO5* می تواند به عنوان یک عامل مستعد کننده خطر سقط مکرر، در زنان باردار به شمار رود. در حالی که به نظر می رسد چندشکلی ژن *RAN* نقش تعیین کننده ای در این زمینه ندارد.

واژه های کلیدی: ژن، چندشکلی، *XPO5*، *RAN*، سقط مکرر، اردبیل

۱- مربی گروه آموزشی ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران
تلفن: ۰۴۱-۴۴۲۳۲۱۶۲، دورنگار: ۰۴۱-۴۴۲۲۸۲۱۱، پست الکترونیکی: ghorbian20@yahoo.com

۲- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر، اهر، ایران

مقدمه

سقط مکرر، به وقوع سه و یا تعداد بیشتر سقط قبل از هفته بیستم حاملگی اطلاق می‌گردد که حدود ۱ درصد از زنان باردار را متأثر می‌کند. بر اساس نتایج منتشر شده، تقریباً ۱۵-۱۰ درصد از حاملگی‌ها به سقط منجر می‌شود که بیشترین میزان وقوع آن در ۳ ماهه اول بارداری رخ می‌دهد [۱-۲]. تقریباً بیش از نیمی از موارد سقط، به دلیل اختلالات کروموزومی در سلول‌های جنسی است [۳-۴]. عوامل متعددی از قبیل ناهنجاری‌های کروموزومی، نقایص ساختمانی رحم، عفونت‌ها، اختلالات سیستم انعقادی، هورمونی و ایمونولوژیکی به عنوان علل سقط‌های مکرر شناخته شده است، ولی با این حال موارد ناشناخته زیادی در این رابطه باقی مانده است [۵-۶]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که مولکول‌های miRNA در فرآیندهای مهم و حیاتی در مراحل جنینی نقش دارند. امروزه، بیش از ۱۵۰۰ مولکول miRNA مختلف در انسان شناسایی شده و تخمین زده شده است که miRNA بیش از ۲۳۰۰ ژن انسان را تنظیم می‌کنند. این مولکول‌ها در فرآیندهای متعددی از جمله رشد و نمو، شرایط فیزیولوژیکی مختلف به‌ویژه در حالت بارداری نقش فعال دارند [۷]. از نظر اندازه، این مولکول‌ها کمتر از ۲۵ نوکلئوتید طول دارند که در تنظیم پس از نسخه‌برداری از طریق پیوند با توالی‌های مکمل بر روی mRNA هدف عمل کرده و در نتیجه منجر به تجزیه mRNA یا مهار آغاز ترجمه می‌گردند. جایگاه اتصال در این مولکول‌ها، ناحیه ترجمه نشده انتهای 3' (3'-UTR) توالی mRNA هدف واقع شده است [۸]. محصولات ژن‌های *Drosha*، *Dicer*، *Xpoin 5* و *RAN* به عنوان مولکول‌های حیاتی در سلول‌های تروفوبلاست جفتی شناسایی شده‌اند که در

بیوژنز و پردازش miRNA نقش دارند [۹]. ژن *RAN* بر روی کروموزوم 12q24.33 قرار دارد که محصول پروتئینی *RAN*، به‌عنوان یک واسطه‌گر با نقش کاملاً شناخته شده برای شناسایی مسیر پیام‌دهی PI3K عنوان شده و قادر است در تهاجم سلول‌های سرطانی نقش مؤثری داشته باشد [۱۰-۱۱].

تغییرات تک نوکلئوتیدی به ویژه در جایگاه (3-UTR) *RAN* rs14035 می‌تواند در کارکرد آن نقش مؤثری داشته باشد [۱۰-۱۱]. در سیستم پردازشی مولکول‌های miRNA کمپلکس XPO5/RAN-GTP باعث انتقال هسته‌ای پیش miRNA می‌شود. ژن *Exportin5* (*XPO5*) بر روی کروموزوم 6p21.1 قرار دارد. جهش‌های ژن *XPO5* سطح تکاملی miRNA را تحت تأثیر منفی قرار داده که منجر به کاهش بازدارندگی ژن هدف می‌شود، این در حالی که است که *XPO5* ذخیره‌سازی شده به عنوان یک عامل سرکوب کننده بدخیمی عمل می‌کند و از خروج پیش miRNA آسیب‌دیده در سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند [۱۲-۱۳]. حضور چندشکلی در ژن‌های رمز کننده miRNA می‌تواند باعث شکل‌گیری ساختارهای ثانویه متفاوت در miRNA شوند و بر میزان پایداری miRNA تأثیر داشته باشد [۱۴]. با توجه به این که مطالعات زیادی مبنی بر شناسایی عوامل دخیل در سقط مکرر انجام شده [۵-۶]، ولی با این حال هم چنان ناشناخته‌های زیادی باقی مانده است. تنها در یک ارزیابی از نقش چندشکلی‌های *XPO5* و *RAN* با خطر سقط‌های مکرر اشاره شده است [۹] که شاید از این لحاظ، دیدگاه‌های جدیدی را در مسیر آسیب‌شناسی سقط‌های مکرر با علت ناشناخته گشوده شود. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های *RAN*

ترومبوز، بیماری‌های خود ایمنی، اختلالات غدد درون‌ریز مورد ارزیابی قرار گرفته بودند. ناهنجاری‌های کروموزومی از طریق تکنیک G-Banding سیتوژنتیکی [۱۶] مورد ارزیابی قرار گرفته بودند، که بیماران فاقد ناهنجاری بودند. معیارهای ورود به مطالعه گروه کنترل، ۱۰۰ خانمی که از نظر نژاد و قومیت ترک، حداقل دارای یک فرزند سالم، فاقد سابقه سقط و از نظر سنی در محدوده زنان گروه بیمار بودند و به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ مراجعه کرده بودند، را شامل می‌شد. به منظور انجام پژوهش مورد نظر، مشخصات هر بیمار از جمله سن، نژاد، تعداد دفعات سقط، تمامی آزمایش‌های انجام شده جهت تعیین علت سقط و محل سکونت با کسب اجازه و رضایت‌مندی کامل از افراد مورد مطالعه مراجعه کننده به بیمارستان ثبت شدند. اطلاعات مذکور به‌صورت کاملاً محرمانه و نمونه‌های خونی به‌صورت کد اختصاری مورد آزمایش قرار گرفتند.

(rs 14035) و XPO5 (rs 2257082) با سقط مکرر در زنان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶ بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر که یک مطالعه توصیفی است، حجم نمونه بر اساس فرمول $n = \frac{z^2 p(1-p)}{d^2}$ و با در نظر گرفتن $P = 0.1$ (نسبتی از جمعیت دارای سقط مکرر) [۱۵]، مقدار متغیر نرمال واحد استاندارد در میزان اطمینان ۹۵ درصد ($Z=1.96$) و میزان خطای قابل تحمل ($d=0.04$) به تعداد ۱۰۰ نفر برآورد شد. ۱۰۰ خانم مبتلاء به سقط مکرر خودبه‌خودی با عامل ناشناخته در مراجعه به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در طی سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶، که حداقل دارای ۳ و یا بیشتر سقط مکرر و بدون سابقه حاملگی موفق بودند، انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه، زنانی بودند که توسط متخصصین زنان و نازایی، متخصصین ژنتیک و آزمایش‌های تخصصی مبنی بر عفونت‌های مزمن،

جدول ۱- توالی آغازگرها، اندازه محصولات تکثیری و آنزیم محدودالایر جهت هضم آنزیمی قطعات تکثیر یافته

نام آغازگرها	توالی آغازگرها	اندازه محصولات PCR	آنزیم محدودالایر
XPO5-F	5'-TCGCAGATGCAGTTACGTGG-3'	۱۳۲ جفت باز	BstUI
XPO5-R	5'-CTTCCCCACTCACCCAGTGCCGC-3'		
RAN-F	5'-GAAGCACTTGCTCAAAAATCTGTGAC-3'	۱۵۲ جفت باز	BstII
RAN-R	5'-TGCCATCCACTGATGTTCCATC-3'		

غلظت و خلوص DNA استخراج شده از طریق روش اسپکتروفتومتری با نانودراپ (Thermo Scientific، آمریکا) تعیین شد. برای ارزیابی فراوانی چندشکلی ژن‌های RAN و EXPO5 از روش PCR-RFLP [۹]

سپس ۲ میلی‌لیتر نمونه خون وریدی از افراد مورد مطالعه که ۱۲ ساعت ناشتا بودند، توسط کارشناس آزمایشگاه دریافت شد. استخراج DNA از نمونه‌های خون کامل با روش نمک اشباع (Salting Out) انجام گرفت.

استفاده شد. برای تکثیر ناحیه اختصاصی، از یک میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم)، (۱۰ پیکومول) یک میکرولیتر آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۱۳ میکرولیتر از Ampliqon Master Mix Red 2x، دانمارک) و ۹ میکرولیتر آب در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط شد. توالی‌های آغازگر در جدول ۱ ذکر شده است.

مراحل PCR با دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) با یک مرحله ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه شروع شد. سپس ۳۵ دور در دماهای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۲۰ ثانیه)، در دمای اتصال ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای XPO5 (۲۰ ثانیه) و ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای RAN برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) تکرار شد. در مرحله پایانی، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد. محصولات تکثیری واکنش PCR برای چندشکلی ژن RAN ۱۵۲ جفت باز و برای XPO5 ۱۳۲ جفت باز حاصل شد. در تأیید تکثیر محصولات اختصاصی، از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ Safe Stain (سینا ژن، ایران) استفاده شد. جهت تعیین فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی RAN، محصولات تکثیری با آنزیم محدودالایر *BstUI* (سوئیس) و برای ژن XPO5 با آنزیم محدودالایر *BsII* (Roche، سوئیس) هضم آنزیمی انجام شد. به منظور هضم آنزیمی بر اساس پروتکل شرکت سازنده، ۷ میکرولیتر محصول PCR، ۷ میکرولیتر 10x Buffer، ۱/۵ میکرولیتر آنزیم و ۶/۴ میکرولیتر آب مخلوط و به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ سانتی‌گراد انکوبه (Memmert، آلمان) شدند [۹]. جهت شناسایی قطعات حاصل از برش، محصولات بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد جدا و با رنگ آمیزی

نیترا نقره شناسایی شدند. بنابراین احتمال ۳ نوع ژنوتیپ (هموزیگوت سالم) CC، (هتروزیگوت) CT و (هموزیگوت موتانت) TT برای هر کدام از چندشکلی‌ها وجود داشت. طول قطعات هضم شده ژن XPO5 در حالت هموزیگوت سالم (CC) ۱۱۰ و ۲۲ جفت باز، هتروزیگوت (CT) ۱۱۰، ۱۳۲ و ۲۲ جفت باز و در حالت هموزیگوت موتانت (TT) ۱۳۲ و ۲۲ جفت باز بود. برای ژن RAN در حالت هموزیگوت سالم (CC) ۱۲۷ و ۲۵ جفت باز، هتروزیگوت (CT) ۱۲۷، ۲۵، ۱۵۲ جفت باز و در حالت هموزیگوت موتانت (TT) ۱۵۲ و ۲۵ جفت باز بود [۹].

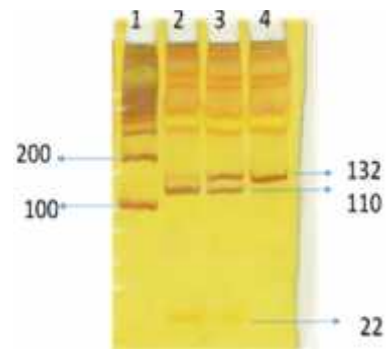
بعد از بررسی تک‌تک افراد از نظر فراوانی ژنوتیپ، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۳ و با آزمون مجذور کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و سطح معنی‌داری، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

از ۱۰۰ نفر زن با سابقه سقط مکرر، ۷۲ درصد دارای ۳ بار سقط، ۲۲ درصد دارای ۴ بار سقط، ۳ درصد دارای ۵ بار سقط و ۳ درصد دارای ۶ بار سابقه سقط بودند. میانگین و انحراف معیار سنی در افراد بیمار 30.71 ± 4.283 سال (دامنه سنی ۲۰-۴۱ سال) و در افراد گروه کنترل 31.24 ± 4.799 سال (دامنه سنی ۴۲-۲۱ سال) بود. اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین سنی در بین افراد دو گروه مشاهده نشد ($P = 0.755$). در مطالعه حاضر، ارتباط بین چندشکلی ژن‌های RAN (rs 14035) و XPO5 (rs 2257082) با خطر سقط مکرر در ۱۰۰ زن با تاریخچه سه بار سقط و بیشتر و ۱۰۰ زن بدون سقط و حداقل با یک فرزند زنده مورد بررسی قرار گرفت.

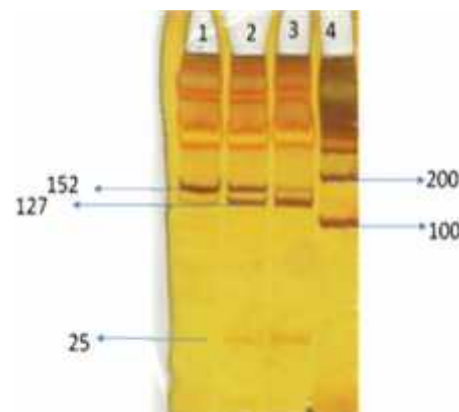
ژنوتیپ هتروزیگوت (CT) و در ستون شماره ۳ فردی با ژنوتیپ هموزیگوت کنترل (CC) نشان داده شده است. فراوانی ژنوتیپها در چندشکلی *XPO5* برای افراد گروه بیمار در CC، CT و TT به ترتیب ۲۸ درصد، ۷۱ درصد و ۱ درصد و برای افراد کنترل به ترتیب ۱۶ درصد، ۸۳ درصد و ۱ درصد بود که از نظر آماری اختلاف معناداری در فراوانی ژنوتیپها بین دو گروه مشاهده نشد ($P=0/122$). فراوانی ژنوتیپها در چندشکلی *RAN* در افراد گروه بیمار برای CC، CT و TT به ترتیب ۷۱ درصد، ۲۵ درصد و ۴ درصد و در گروه کنترل ۷۱ درصد، ۲۳ درصد و ۶ درصد نشان داده شد که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد ($P=0/785$).

در این مطالعه، به منظور احتمال اختلاف معنی‌داری ژنوتیپها در الگوهای توارثی غالب، مغلوب و هتروزیگوت، هر سه ژنوتیپ به صورت تک‌تک در دو گروه بیمار و کنترل مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپها در چندشکلی *XPO5* (rs 2257082) در الگوهای توارثی غالب ($OR=0/490$; $CI:0/246-0/977$, $P=0/041$) و هم‌بارزی ($OR=0/501$; $CI:0/255-0/987$, $P=0/044$) اختلاف معنی‌داری را نشان داد. نتایج این ارزیابی نشان داد که چندشکلی در ژن *XPO5* خطر ابتلاء زنان به سقط را افزایش می‌دهد. البته در حالت مغلوب، به دلیل یکسان بودن فراوانی ژنوتیپها در هر دو گروه، اختلافی مشاهده نشد. این در حالی است که فراوانی ژنوتیپها در چندشکلی *RAN* (rs 14035) در هیچ یک از الگوهای توارثی مغلوب ($CI:0/178-2/387$, $P=0/516$) و هم‌بارزی ($OR=0/653$; $CI:0/583-2/136$, $P=0/741$) و غالب (یکسان بودن فراوانی ژنوتیپها) ($OR=1/116$) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج این ارزیابی نشان



شکل ۱- نتایج PCR-RFLP برای چندشکلی ژن *XPO5* در ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد. ستون ۱: شاخص وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی (100bp)، ستون ۲: هموزیگوت سالم (CC)، ستون ۳: هتروزیگوت (CT)، ستون ۴: هموزیگوت مواتنت (TT).

در شکل ۱ نمونه‌ای از تصویر ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد حاصل از نتایج PCR-RFLP ژن *XPO5* نشان داده شده است. ستون شماره ۲ فردی با ژنوتیپ هموزیگوت سالم (CC)، ستون شماره ۳ فردی با ژنوتیپ هتروزیگوت (CT) و ستون شماره ۴ فردی با ژنوتیپ هموزیگوت مواتنت (TT) نشان می‌دهد.



شکل ۲- نتایج PCR-RFLP برای چندشکلی ژن *RAN* در ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد. ستون ۱: هموزیگوت مواتنت (TT)، ستون ۲: هتروزیگوت (CT)، ستون ۳: هموزیگوت سالم (CC)، ستون ۴: شاخص وزن مولکولی 100 جفت بازی (100bp).

شکل ۲، نمونه‌ای از تصویر ژل پلی‌آکریل آمید ۱۰ درصد حاصل از نتایج PCR-RFLP ژن *RAN* نشان داده شده است. در ستون شماره ۱ فردی با ژنوتیپ هموزیگوت مواتنت (TT)، در ستون شماره ۲ فردی با

داد که چندشکلی در ژن RAN، با افزایش خطر ابتلاء زنان به سقط همراهی ندارد. نتایج حاصل از آنالیزهای آماری، نسبت شانس (Odd ratio; OR) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد برای نسبت شانس (Coefficient interval; CI) برای هر کدام از ژنوتیپ‌های این دو ژن به‌طور جداگانه در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۲- مقایسه فراوانی ژنوتیپ‌های چندشکلی ژن XPO5 و RAN در افراد کنترل و بیماران با سابقه سقط مکرر مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردیبهیل در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۶

فاصله اطمینان ۹۵ درصد	نسبت شانس	مقدار P	چندشکلی ژن‌ها	
			گروه بیمار (تعداد=۱۰۰) (درصد)	گروه کنترل (تعداد=۱۰۰) (درصد)
چندشکلی ژن RAN				
			الگوی مغلوب	
			TT	
۰/۱۷۸	۲/۳۸۷	۰/۶۵۳	۴	۶
			CT+CC	۹۴
			الگوی هم‌بارزی	
			CT	۲۵
۰/۵۸۳	۲/۱۳۶	۱/۱۱۶	۷۵	۲۳
			TT+CC	۷۷
چندشکلی ژن XPO5				
			الگوی غالب	
			CC	
۰/۲۴۶	۰/۹۷۷	۰/۴۹۰	۲۸	۱۶
			CT+TT	۸۴
			الگوی هم‌بارزی	
			CT	۲۹
۰/۲۵۵	۰/۹۸۷	۰/۵۰۱	۷۱	۱۷
			TT+CC	۸۳

* آنالیز با آزمون مجذور کای، اختلاف معناداری $p < 0.05$

بحث

است که برای چندشکلی ژن RAN (rs 14035) این ارتباط معنی‌دار مشاهده نشد. روند بیوژنز miRNAها، یک فرآیند چندمرحله‌ای است که از هسته سلول شروع و در ادامه با مرحله رونویسی ادامه می‌یابد تا سیتوپلاسم ختم می‌شود. در سیتوپلاسم مولکول miRNA بالغ فعالیت اصلی خود را شروع می‌کند. به نظر می‌رسد هرکدام از مراحل بیوژنز miRNA کاملاً با هم هماهنگ هستند. Drosha با برش‌های خاصی از حلقه miRNA در هسته این فرآیند را آغاز می‌کند. ساختار حاصل که

این مطالعه به بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های RAN و XPO5 می‌پردازد که در روند بیوژنز و پردازش miRNA نقش دارند و با احتمال افزایش خطر سقط مکرر خود به خودی می‌توانند دخیل باشند. نتایج این مطالعه نشان داد که در چندشکلی XPO5 (rs 2257082)، ارتباط معنی‌داری بین الگوهای توارثی غالب و هم‌بارزی با خطر سقط‌های مکرر خودبه‌خودی وجود دارد. این در حالی

پیش‌ساز pre-miRNAها است به‌عنوان ساختار اصلی برای تمام dsRNA محسوب می‌شود. Exportin 5 این ساختار را شناسایی و pre-miRNA را از طریق منافذ هسته موجود را با کمک مکانیسم وابسته به RAN-GTP به سمت سیتوپلاسم هدایت می‌کند. بعد از انتقال به سیتوپلاسم، pre-miRNA به آنزیم RNase II که Dicer نام دارد تحویل داده می‌شود که در مرحله بعد، این آنزیم با تولید miRNA دو رشته‌ای مسیر را برای ادامه بلوغ miRNAها فراهم می‌کند [۱۷]. طبق مطالعات انجام شده، چندشکلی‌هایی که در ژن‌های رمز کننده miRNA قرار دارند ممکن است در ایجاد ساختارهای ثانویه متفاوت در miRNA منجر شوند که در نتیجه می‌تواند بر میزان پایداری miRNA وابسته تأثیر گذار باشد [۹].

miRNAها، مولکول‌های RNA کوچک و رمزگذاری نشده، می‌تواند مسیر تنظیم بیان ژنی را تحت تأثیر قرار دهند، به‌طوری‌که با دخالت در تجزیه سلول‌های تروفوبلاستی، تکثیر سلولی و رگ زایی، رشد جفت و جنین را تحت تأثیر قرار داده و از این لحاظ، دیدگاه‌های جدیدی در مسیر آسیب‌شناسی سقط‌های مکرر با علت ناشناخته مطرح شود [۱۴]. در ارتباط با ارزیابی بین چندشکلی‌های ژن‌های دخیل در بیوژنز و پردازش miRNAها مطالعاتی در برخی از انواع سرطان‌ها و ناهنجاری‌ها انجام شده ولی در ارتباط با سقط‌های مکرر، تنها یک مورد گزارش شده است [۲۱-۱۸]. در بررسی Cho و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان ارزیابی خطر ابتلاء به سرطان کلورکتال با چندشکلی‌های 3-UTR در ژن‌های *XPO5* و *RAN*، *DICER1*، *DROSHA*، از ماشین پردازش کننده miRNAها که بر روی ۴۰۸ فرد بیمار و ۴۰۰ فرد سالم انجام شده بود نشان دادند که ژنوتیپ

XPO5 rs11077 AC+CC خطر ابتلاء به سرطان کلورکتال را افزایش می‌دهد. نتایج آن‌ها نشان داد که چندشکلی‌های *RAN*rs14035، *DICER1* rs3742330، *XPO5*rs11077 و *DROSHA* rs10719 در جمعیت کره به‌طور قابل توجه‌ای خطر سرطان کلورکتال را افزایش داده است [۱۸]. در مطالعه Osuch-Wojcikiewicz و همکارانش که ارتباط بین تغییرات چندشکلی در ژن‌های پردازش کننده ماشین miRNAها با خطر سرطان حنجره در جمعیت لهستان، بررسی شده بود، مشخص شد که فراوانی تغییرات چندشکلی GT و TT در ژن *XPO5* در گروه بیمار بیشتر از سالم بود و فراوانی ژنوتیپ CT در ژن *RNA* در افراد گروه سالم بیشتر از بیمار بود. نتایج ارزیابی این مطالعه نشان داد که چندشکلی‌های در ژن‌های مذکور خطر ابتلاء به سرطان حنجره را افزایش داده است [۱۹]. همچنین Zhou و همکاران نشان دادند که حضور چندشکلی‌ها می‌تواند استعداد ابتلاء به شیخوفرنی را افزایش دهد [۲۰]. Jung و همکاران نیز ارتباط بین تغییرات ژنتیکی در ژن‌های ماشین پردازش کننده miRNAها با خطر سقط‌های مکرر خود به خودی با عامل ناشناخته را مورد بررسی قرار دادند که در این مطالعه چندشکلی‌های *DICER* (rs3742330)، *RAN* GTPase (*RAN*)، *DROSHA* (rs10719) و *XPO5* (rs11077) با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ CC *RAN* (rs14035) با ژنوتیپ‌های *DICER* (rs3742330)/*DROSHA* (rs10719) و GG/TC+CC (rs3742330)/*RAN* (rs14035) و *DICER* (rs3742330)/*XPO5* (rs11077) و GG/AC+CC به‌طور مجموع خطر سقط‌های مکرر را

افزایش داده‌اند. این در حالی است که ژنوتیپ RAN CT (rs14035) با ژنوتیپ‌های DICER (rs3742330)/RAN (rs14035) AA+AG/CT+TT ، DROSHA (rs10719)/RAN (rs14035) ، TC+CC/CT+TT و RAN (rs14035)/XPO5 (rs11077) و CT+TT/AA مجموعاً خطر سقط‌های مکرر را کاهش داده بودند [۲۱].

نتایج بررسی حاضر در تضاد با مطالعه قبلی، هیچ ارتباط معنی‌داری از نظر آماری بین چندشکلی RAN (rs14035) با افزایش خطر سقط‌های مکرر را نشان نداد. نتایج مطالعه حاضر حاکی از ارتباط آماری معنی‌دار بین چندشکلی ژن XPO5 (rs2257082) با خطر سقط‌های مکرر خود به خودی بود. این در حالی است که در مطالعه قبلی [۲۱]، به جای این چندشکلی، XPO5 (rs 11077) را بررسی کرده بودند. همچنین برای اولین باری است که گزارشی مبنی بر وجود ارتباط معنی‌دار بین rs 2257082 با سقط‌های مکرر خود به خودی گزارش می‌شود. در مطالعه Rah و همکاران که بر روی زنان واجد نقایص عملکردی تخمدان انجام شده بود، ارتباط معنی‌داری برای چندشکلی ژن XPO5 (rs 2257082) با خطر نقایص عملکردی تخمدان گزارش شد [۹]. تناقض مشاهده شده بین بررسی‌های انجام شده بر روی چندشکلی ژن‌های دخیل در بیوتزن miRNAها در مطالعات مختلف، می‌تواند ناشی از اختلاف در توزیع فراوانی چندشکلی‌ها در مناطق جغرافیایی مختلف، نژاد و قومیت‌های مختلف و زمینه ژنتیکی متفاوت و یا حتی خطاهای ناشی از ارزیابی توسط محققین باشد. علاوه بر این، معیارهای مختلفی در انتخاب گروه زنان بیمار لحاظ می‌شود که می‌تواند منجر به نتایج مختلفی در ارزیابی‌های مختلف گردد. مزیتی که مطالعه

حاضر دارد این است که در انتخاب نمونه‌های بیمار، معیارهای ورود و خروج از مطالعه با دقت و حساسیت بالایی صورت گرفته است. این افراد دارای حداقل سه بار سقط می‌باشند و نتایج آزمایش‌های روزمره سیتوژنتیکی G-Banding، از نظر ناهنجاری‌های کروموزومی کاملاً طبیعی گزارش شده بود و هیچ اختلال بالینی دیگری نداشتند و افرادی که احتمال داده می‌شد، دارای علل دیگری برای سقط داشته باشند از جامعه مورد بررسی خارج شده بودند. با توجه به این که در این افراد، هیچ گونه ناهنجاری سیتوژنتیکی، آناتومیکی و هم چنین در سایر آزمایش‌هایی که در ارتباط با سقط‌های مکرر به صورت روزمره مورد توجه قرار می‌گیرد، اختلالی مشاهده نشده بود، بنابراین، ارتباط بین وجود این چندشکلی ژن XPO5 با خطر سقط را قوت می‌بخشد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به دسترسی مشکل به افراد مورد مطالعه، کمبود منابع مالی، ارزیابی این مطالعه تنها در زنان با نژاد خاص (ترک) و زنان واجد شرایطی که فقط به این مرکز درمانی در طی سال‌های مورد بررسی مراجعه کرده بودند، می‌توان اشاره کرد. علاوه بر این، در این مطالعه برای هر کدام از ژن‌های هدف، فقط یک چندشکلی مورد بررسی قرار گرفت که ممکن است چندشکلی‌های دیگری از این ژن‌ها، در مستعد کردن زنان به سقط‌های مکرر نقش داشته باشند. در انتها پیشنهاد می‌گردد که چندشکلی‌های بیشتری از این ژن‌ها و ژن‌های دیگری که در مسیر پردازش miRNAها نقش دارند مورد ارزیابی قرار گیرند. هم چنین می‌توان در مطالعات آتی، میزان تغییرات بیان ژنی و تغییرات الگوی متیلاسیون پرموت‌های ژن‌های مذکور

به خودی با عامل ناشناخته مورد توجه قرار گیرد. البته جهت تأیید همراهی یک چندشکلی در ژن با یک اختلال خاص لازم است که آن را در جمعیت‌هایی با نژادهای مختلف و مناطق جغرافیایی که فراوانی ژنی متفاوتی دارند، مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با مساعدت کارکنان بخش مدارک پزشکی (اخذ مشخصات بیماران) و آزمایشگاه (جهت دریافت نمونه خون) بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل انجام گرفت که بدین وسیله از کلیه زنانی که در این مطالعه شرکت کردند و ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

به همراه سایر ژن‌های درگیر در مسیر پردازش miRNAها را در این نوع افراد مورد ارزیابی قرار داد. لازم به ذکر است که جهت تأیید این نتایج به انجام مطالعات بیشتر و در جمعیت‌هایی با قومیت و نژاد مختلف نیاز است و نمی‌توان ژنتیکی بودن یک اختلال خاص را با نتایج گزارش‌های چند بررسی محدود در جمعیت‌های خاص اذعان کرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که چندشکلی در برخی ژن‌های دخیل در بیوزنز و پردازش miRNAها ممکن است به‌عنوان عامل خطر برای سقط مکرر زنان در جمعیت مورد مطالعه نقش داشته باشد و شاید به‌عنوان یک ژن کاندید جدید در ارزیابی‌های سقط‌های مکرر خود

References

- [1] Sathiyathan S. Re: Preventing recurrent miscarriage of unknown aetiology. *Obstet & Gynecol* 2014; 16(1): 64.
- [2] Talaviya P, Suvagiya V. A Review on Recurrent miscarriage. *J Pharm Rese* 2011; 4(11): 4243-8.
- [3] Hyde KJ, Schust DJ. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5(3): a023119.
- [4] Morley L, Shillito J, Tang T. Preventing recurrent miscarriage of unknown aetiology. *Obstet & Gynecol* 2013; 15(2): 99-105.
- [5] Ghorbian S, Saliminejad K, Sadeghi MR, Javadi GR, Kamali K, Amirjannati N, et al. The Association between Y Chromosome Microdeletion and Recurrent Pregnancy Loss. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14(6): 358-62.
- [6] Meshkat Z, Ghaebi NK, Khajedaluae M, Aghili Z, Rostami S. Prevalence of chromosomal

- aberrations in couples with recurrent miscarriages in the city of Mashhad, Iran: a cross-sectional study. *Arch Med Lab Sci* 2016; 2(1): 19-23.
- [7] Parveen F, Agrawal S. Recurrent Miscarriage and Micro-RNA Among North Indian Women. *Reprod Sci* 2015; 22(4): 410-5.
- [8] Desvignes T, Batzel P, Berezikov E, Eilbeck K, Eppig JT, McAndrews MS, et al. miRNA nomenclature: a view incorporating genetic origins, biosynthetic pathways, and sequence variants. *Trends Genet* 2015; 31(11): 613-26.
- [9] Rah H, Jeon YJ, Lee BE, Kim JO, Shim SH, Lee WS, et al. Association of polymorphisms in microRNA machinery genes (DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5) with risk of idiopathic primary ovarian insufficiency in Korean women. *Menopause* 2013; 20(10): 1067-73.
- [10] Iwakawa HO, Tomari Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends Cell Biol* 2015; 25(11): 651-65.
- [11] Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol* 2015; 25(3): 137-47.
- [12] Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 2015; 16(7): 421.
- [13] Neeb ZT, Zahler AM. An expanding world of small RNAs. *Dev Cell* 2014; 28(2): 111-2.
- [14] Jeon YJ, Choi YS, Rah H, Kim SY, Choi DH, Cha SH, et al. Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. *Gene* 2012; 494(2): 168-73.
- [15] Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol* 2009; 2(2): 76-83.
- [16] Wang BT, Chong TP, Boyar FZ, Kopita KA, Ross LP, El-Naggar MM, et al. Abnormalities in spontaneous abortions detected by G-banding and chromosomal microarray analysis (CMA) at a national reference laboratory. *Springerplus* 2016 24; 5(1): 874.
- [17] Lee D, Shin C. Emerging roles of DROSHA beyond primary microRNA processing. *RNA Biol* 2018; 15(2): 186-93.
- [18] Cho SH, Ko JJ, Kim JO, Jeon YJ, Yoo JK, Oh J, et al. 3'-UTR Polymorphisms in the MiRNA Machinery Genes DROSHA, DICER1, RAN, and XPO5 Are Associated with Colorectal Cancer Risk in a Korean Population. *PloS one* 2015; 10(7): e0131125.

- [19] Osuch-Wojcikiewicz E, Bruzgielewicz A, Niemczyk K, Sieniawska-Buccella O, Nowak A, Walczak A, et al. Association of polymorphic variants of miRNA processing genes with larynx cancer risk in a polish population. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 298378.
- [20] Zhou Y, Wang J, Lu X, Song X, Ye Y, Zhou J, et al. Evaluation of six SNPs of MicroRNA machinery genes and risk of schizophrenia. *J Mol Neurosci* 2013; 49(3): 594-9.
- [21] Jung YW, Jeon YJ, Rah H, Kim JH, Shin JE, Choi DH, et al. Genetic variants in microRNA machinery genes are associate with idiopathic recurrent pregnancy loss risk. *PloS one* 2014; 9(4): e95803.

Investigating the Association of RAN (rs 14035) and XPO5 (rs 2257082) Genes Polymorphisms with the Recurrent Pregnancy Loss in Women Referred to Imam Khomeini Hospital of Ardabil During 2015-2017 Years

N. Tohidi¹, S. Ghorbian²

Received: 21/10/2017 Sent for Revision: 13/01/2018 Received Revised Manuscript: 15/04/2018 Accepted: 16/04/2018

Background and Objectives: XPO5 is one of the important molecules that has been identified in the trophoblast cells of the placenta, which is involved in the miRNAs biogenesis and processing. RAN is the other protein, which is involved in the miRNAs processing. The presence of RAN (rs 14035) and XPO5 (rs 2257082) genes may affect the genes expression adjustment in the mother's uterine and lead to the recurrent abortion. The aim of this investigation was to evaluate the association of rs 14035 and rs 2257082 genes polymorphism with the recurrent pregnancy loss (RPL) in women referred to Imam Khomeini Hospital of Ardabil during 2015-2017 Years.

Materials and Methods: This descriptive study included 100 women with RPL with unknown reason and 100 women that had a successful pregnancy without abortion, and with an alive child, which referred to Imam Khomeini Hospital of Ardabil during 2015-2017 years. After DNA extraction, by PCR-RFLP method, the frequencies of these polymorphisms were evaluated and data were analyzed using chi-square test.

Results: There was a significant association between the CC/CT+TT and CT/CC+TT genotypes in XPO5 gene polymorphism and the risk of abortion ($p=0.041$). Whereas, the genotypes frequency of RAN gene polymorphism did not reveal any statistical significant difference across the two groups ($p=0.516$).

Conclusion: The findings revealed that XPO5 gene polymorphism may be contributed as a predisposing risk factor to RPL in the pregnant women. Whereas, it seems that the RAN gene polymorphism cannot be considered as a risk factor for predisposing of RPL.

Key words: Gene, Polymorphism, XPO5, RAN, Recurrent pregnancy loss, Ardabil

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Islamic Azad University of Ahar Branch approved the study.

How to cite this article: Tohidi N, Ghorbian S. Investigating the Association of RAN (rs 14035) and XPO5 (rs 2257082) Genes Polymorphisms with the Recurrent Pregnancy Loss in Women Referred to Imam Khomeini Hospital of Ardabil During 2015-2017 Years. *Univ Med Sci* 2018; 17 (3): 201-12. [Farsi]

1- Instructor, Dept. of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran, ORCID: 0000-0003-3039-3178

2- Assistant Prof., Dept. of Molecular Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ahar Branch, Ahar, Iran, ORCID: 0000-0003-0780-3159

(Corresponding Author) Tel: (041) 44232162, Fax:(041) 44228211, E-mail: ghorbian20@yahoo.com