مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۷، خرداد ۱۳۹۷، ۲۱۲-۲۰۱

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

نگین توحیدی[۱]، سعید قربیان[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 مولکول‌های مهم در سلول‌های تروفوبلاستی جفت، پروتئین (rs 2257082) *XPO5* است که در بیوژنز و پردازش miRNAها نقش دارد. از پروتئین‌های دیگری که در فرآیند پردازشی و تکاملی miRNAها نقش دارند، RAN است. وجود ژن‌های (rs 14035) *RAN* و *XPO5* ممکن است بر تنظیم بیان ژن‌ها در رحم مادر اثرگذار باشد و موجب خطر سقط‌های مکرر شود. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های rs 14035 و rs 2257082 با سقط مکرر در زنان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ بود.

مواد و روش‌ها: 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 مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ انجام شد. بعد از استخراج DNA، با روش PCR-RFLP فراوانی این چندشکلی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و داده ها با آزمون آماری مجذور کای، تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: ارتباط معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های CC/CT+TT و CT/CC+TT در چندشکلی ژن *XPO5*، با خطر سقط مشاهده شد (P=۰/۰۴۱). این در حالی است که فراوانی ژنوتیپ ها برای چندشکلی ژن *RAN*، اختلاف معنی‌داری را از نظر آماری بین دو گروه زنان نشان نداد (P=۰/۵۱۶).

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که چندشکلی ژن *XPO5* می‌تواند به عنوان یک عامل مستعد کننده خطر سقط مکرر، در زنان باردار به شمار رود. درحالی‌که به نظر می‌رسد چندشکلی ژن *RAN* نقش تعیین کننده‌ای در این زمینه ندارد.

واژه‌های 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 [۲-۱]. تقریباً بیش از نیمی از موارد سقط، به دلیل اختلالات کروموزومی در سلول‌های جنسی است [۴-۳]. عوامل متعددی از قبیل ناهنجاری‌های کروموزومی، نقایص ساختمانی رحم، عفونت‌ها، اختلالات سیستم انعقادی، هورمونی و ایمیونولوژیکی به عنوان علل سقط‌های مکرر شناخته شده است، ولی با این‌حال موارد ناشناخته زیادی در این رابطه باقی مانده است [۶-۵]. 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 ازجمله 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*، *Xportin 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 [۱۱-۱۰].

تغییرات تک نوکلئوتیدی به ویژه در جایگاه (3′-UTR) *RAN* rs14035 می‌تواند در کارکرد آن نقش مؤثری داشته باشد [۱۱-۱۰]. در سیستم پردازشی مولکول‌های miRNA، کمپلکسXPO5/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 [۱۳-۱۲]. 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 [۶-۵]، ولی بااین‌حال 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*

(rs 14035) و *XPO5* (rs 2257082) با سقط مکرر در زنان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) اردبیل در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵ 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 ۱۳۹۶-۱۳۹۵، 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، 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 ۱۳۹۶-۱۳۹۵ مراجعه کرده بودند، را شامل می شد. به منظور انجام پژوهش مورد نظر، مشخصات هر بیمار ازجمله 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.

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

آنزیم محدودالاثر	اندازه محصولات PCR	توالی آغازگرها	نام آغازگرها
BstUI	۱۳۲ جفت باز	5'-TCGCAGATGCAGTTACGTGG- 3' 5'- CTTCCCCACTCACCAGTGCCGC-3'	XPO5-F XPO5-R
BsII	۱۵۲ جفت باز	5'-GAAGCACTTGCTCAAAATCTGTGAC-3' 5'-TGCCATCCACTGATGTTCCATC-3'	RAN-F RAN-R

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. 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]

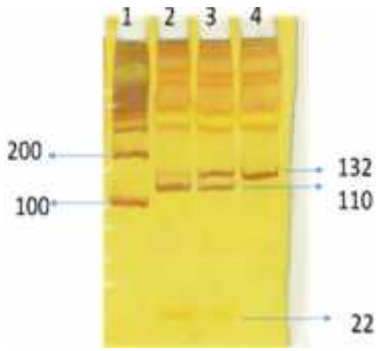
استفاده شد. برای تکثیر ناحیه اختصاصی، از یک میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم)، (۱۰ پیکومول) یک میکرولیتر آغازگرهای مستقیم و معکوس، ۱۳ میکرولیتر از Ampliqon) Master Mix Red 2x، دانمارک) و ۹ میکرولیتر آب در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر مخلوط شد. توالی‌های آغازگر در جدول ۱ ذکر شده است.

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 *EXPO5* (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* ۱۳۲جفت 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 محدودالاثر *BstUI* (Roche، سوئیس) و برای ژن *XPO5* با آنزیم محدودالاثر *BsII* (Roche، سوئیس) هضم آنزیمی انجام شد. به‌منظور هضم آنزیمی بر اساس پروتکل شرکت سازنده، ۷ میکرولیتر محصول PCR، ۷ میکرولیتر Buffer10x، 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 نیترات 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.

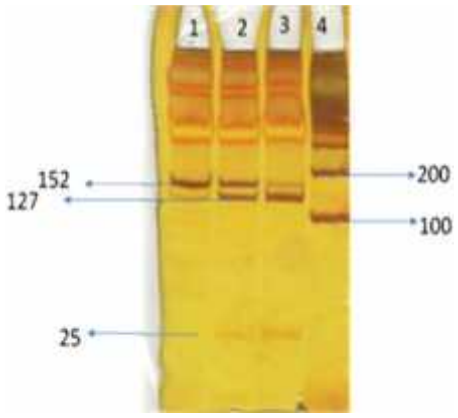
نتایج

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 ۴/۲۸۳±۳۰/۷۱ سال (دامنه سنی ۴۱-۲۰ سال) و در افراد گروه کنترل ۴/۷۹۹±۳۱/۲۴ سال (دامنه سنی ۴۲-۲۱ سال) بود. اختلاف معنی‌داری از نظر میانگین سنی در بین افراد دو گروه مشاهده نشد (P =۰/۷۵۵). در مطالعه حاضر، ارتباط بین چندشکلی ژن‌های (rs 14035) *RAN* و (rs 2257082) *XPO5* 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.



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

در شکل ۱ نمونه‌ای از تصویر ژل پلی آکریل 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 موتانت (TT) نشان می‌دهد.



شکل ۲- نتایج PCR-RFLP برای چندشکلی ژن RAN در ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد. ستون ۱: هموزیگوت موتانت (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 موتانت (TT)، در ستون شماره ۲ فردی با 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=۰/۱۲۲). فراوانی ژنوتیپ ها 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=۰/۷۸۵).

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=۰/۴۹۰; CI:۰/۲۴۶-۰/۹۷۷, P=۰/۰۴۱) و هم‌بارزی (OR=۰/۵۰۱; CI:۰/۲۵۵-۰/۹۸۷ ،P=۰/۰۴۴) 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:۰/۱۷۸-۲/۳۸۷, P=۰/۵۱۶ ;OR=۰/۶۵۳)، هم‌بارزی (CI:۰/۵۸۳-۲/۱۳۶, P=۰/۷۴۱، OR=۱/۱۱۶) و غالب (یکسان بودن فراوانی ژنوتیپ‌ها) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج این ارزیابی نشان

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) اردبیل در سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۵

چندشکلی ژن‌ها	گروه بیمار (تعداد=۱۰۰) (درصد)	گروه کنترل (تعداد=۱۰۰) (درصد)	مقدار P	نسبت شانس	فاصله اطمینان ۹۵ درصد	
					بالا	پایین
چندشکلی ژن *RAN*						
الگوی مغلوب			۰/۵۱۶	۰/۶۵۳	۲/۳۸۷	۰/۱۷۸
TT	۴	۶				
CT+ CC	۹۶	۹۴				
الگوی هم‌بارزی			۰/۷۴۱	۱/۱۱۶	۲/۱۳۶	۰/۵۸۳
CT	۲۵	۲۳				
TT+CC	۷۵	۷۷				
چندشکلی ژن *XPO5*						
الگوی غالب			۰/۰۴۱	۰/۴۹۰	۰/۹۷۷	۰/۲۴۶
CC	۲۸	۱۶				
CT+TT	۷۲	۸۴				
الگوی هم‌بارزی			۰/۰۴۴	۰/۵۰۱	۰/۹۸۷	۰/۲۵۵
CT	۲۹	۱۷				
TT+CC	۷۱	۸۳				

***آنالیز با آزمون مجذور کای، اختلاف معناداری $p<۰/۰۵$**

بحث

این مطالعه به بررسی ارتباط بین چندشکلی ژن‌های *RAN* و *XPO5* می پردازد که در روند بیوژنز و پردازش miRNA نقش دارند و با احتمال افزایش خطر سقط مکرر خود به خودی می توانند دخیل باشند. نتایج این مطالعه نشان داد که در چندشکلی (rs 2257082) *XPO5*، ارتباط معنی‌داری بین الگوهای توارثی غالب و هم‌بارزی با خطر سقط‌های مکرر خودبه‌خودی وجود دارد. این در حالی است که برای چندشکلی ژن (rs 14035) *RAN*، *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

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 RNasII 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 *DROSHA*، *DICER1*، *RAN* و*XPO5* 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 کولورکتال را افزایش می‌دهد. نتایج آن‌ها نشان داد که چندشکلی‌های RANrs14035، DICER1 rs3742330، XPO5rs11077 وDROSHA 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 ژنوتیپی 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 می‌توانند استعداد ابتلاء به شیزوفرنی 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)، *DROSHA* (rs10719)، *RAN* GTPase (*RAN*) (rs14035) و *XPO5* (rs11077) با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ژنوتیپ *RAN* (rs14035) CC با ژنوتیپ‌های *DICER* (rs3742330)/*DROSHA* (rs10719) GG/TC+CC، *DICER* (rs3742330)/*RAN* (rs14035) GG/CC و *DICER* (rs3742330)/*XPO5* (rs11077) GG/AC+CC به‌طور مجموع خطر سقط‌های مکرر را

افزایش داده‌اند. این در حالی است که ژنوتیپ *RAN* (rs14035) CT با ژنوتیپ‌های *DICER* (rs3742330)/*RAN* (rs14035) AA+AG/CT+TT، *DROSHA* (rs10719)/RAN (rs14035) TC+CC/CT+TT و *RAN* (rs14035)/XPO5 (rs11077) 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 بیوژنز 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 می باشند و نتایج آزمایش‌های روزمره سیتوژنتیکی G-Banding، ازنظر 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 به‌صورت 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، می توان اشاره کرد. علاوه براین، 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 پروموترهای ژن‌های مذکور

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 بیوژنز 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 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.

References

[1] Sathiyathasan 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, Khajedaluee 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 Bio*l 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 25; 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. Tohidi[1], S. Ghorbian[2]

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