

مقایسه سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر در نمونه جفت زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی و سالم

دکتر گیتی رحیمی^۱، دکتر سید سعید حسینی اصل^۲، دکتر مریم مرغوب^۳، حامد سیف الهی^۴، دکتر فیروز امانی^۵، دکتر سمیرا شهباززادگان^{۶*}

۱. دانشیار گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۲. دانشیار ژنتیک گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی و پیراپزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۳. متخصص زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۴. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۵. دانشیار گروه آمار زیستی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.
۶. استادیار گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۶

خلاصه

مقدمه: پره‌اکلامپسی نوعی سندرم اختصاصی حاملگی است که تمام اعضای بدن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یکی از علل احتمالی پره‌اکلامپسی، عوامل ژنتیکی از جمله ژن‌های زمینه‌ساز ارثی می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف مقایسه سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر در نمونه جفت زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی و سالم انجام شد. **روش کار:** در این مطالعه مورد-شاهدی که در سال ۹۷-۱۳۹۶ انجام شد، از ۲۵ زن مبتلا به پره‌اکلامپسی که به بیمارستان علوی اردبیل مراجعه نمودند و کاندید ختم بارداری شدند، نمونه جفت تهیه شد و برای گروه کنترل نیز از ۲۵ زن فاقد بیماری نمونه جفت تهیه شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA میزان بیان ژن TERRA با استفاده از Real Time PCR و تغییرات طول تلومر با استفاده از تکنیک Telomere Length Assay اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون تی مستقل انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: میانگین به‌دست آمده برای سطح بیان LncRNA TERRA در گروه مورد $7/87 \pm 1/9$ و در گروه شاهد $9/8 \pm 2/8$ بود که بر اساس نتایج آزمون تی مستقل بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ سطح بیان LncRNA TERRA وجود داشت ($p=0/006$). در بررسی تفاوت طول تلومر در دو گروه، میانگین به‌دست آمده برای طول تلومر در گروه مورد $4/35 \pm 1/9$ و در گروه شاهد $6/2 \pm 1/54$ بود که بر اساس نتایج آزمون تی مستقل بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ طول تلومر وجود داشت ($p=0/001$). بین سن مادران و سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر همبستگی معنی‌داری وجود نداشت ($p=0/88$). بین جنسیت نوزادان در سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر ارتباطی وجود نداشت ($p=0/1$).

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده از این مطالعه بیانگر نقش مشخص LncRNA TERRA و طول تلومر در پره‌اکلامپسی می‌باشند. می‌توان از دو معیار سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر در پیش‌بینی و تشخیص پره‌اکلامپسی استفاده نمود.

کلمات کلیدی: پره‌اکلامپسی، سطح بیان TERRA، طول تلومر

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر سمیرا شهباززادگان؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران. تلفن: ۰۴۵-۳۳۷۲۶۰۸۵؛ پست الکترونیک: samirashahbazzadegan2000@yahoo.com

مقدمه

پره‌اکلامپسی نوعی بیماری اختصاصی حاملگی است که با افزایش فشارخون و پروتئینوری مشخص می‌شود. شروع افزایش فشارخون و پروتئینوری بین ۲۸-۳۴ هفته، پره‌اکلامپسی زودرس و بعد از ۳۴ هفته، پره‌اکلامپسی با شروع دیررس نامیده می‌شود (۱). یکی از علل احتمالی پره‌اکلامپسی، عوامل ژنتیکی از جمله ژن‌های زمینه‌ساز ارثی می‌باشد (۲). تلومرها ساختارهای نوکلئوپروتئینی متشکل از تکرار توالی TTAGGG در انتهای کروموزوم یوکاریوت‌ها می‌باشند و از انتهای کروموزوم محافظت می‌نمایند (۳). به دلیل مشکل انتهای همانندسازی، طول تلومرها در هر بار تقسیم سلولی پیوسته کاهش می‌یابد. اگر طول تلومرها از حد معینی کوتاه‌تر شوند، باعث پیری سلول، آپوپتوز و سرطان می‌شود. تلومرها در ناحیه ساب‌تلومریک نزدیک انتهای کروموزوم به RNA غیر کد کننده^۱ (LncRNA) به نام TERRA^۲ رونویسی می‌شوند. TERRA در تنظیم طول تلومرها و مهار آنزیم تلومراز نقش دارد. فعالیت تلومراز منجر به سنتز و حفظ توالی‌های تلومریک در انتهای کروموزوم می‌شود (۳، ۴). در بیماران با فشارخون بالا، طول تلومر کوتاه‌تر گزارش شده است؛ به عبارت دیگر فشارخون بالا با طول کوتاه تلومر و فعالیت پایین آنزیم تلومراز در ارتباط است. در مطالعات انجام شده تلومرها با طول کوتاه‌تر در پره‌اکلامپسی یافت شده است و افزایش سطح تراکم تلومر در جفت پره‌اکلامپسی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شده است (۵).

در سه ماهه اول بارداری فعالیت تلومراز در تروفوبلاست جفت بسیار بالا می‌باشد و در طول مدت بارداری، فعالیت آن کاهش می‌یابد. تروفوبلاست‌ها ظرفیت منحصر به فرد تکثیر سریع و حمله به دیواره رحم را دارند. این توانایی به جفت، شخصیتی مشابه تومور می‌بخشد. این پدیده به طور عمده در آغاز بارداری منجر به تکامل جفت و در نهایت ورود جفت به حالت پیری می‌شود. طول تلومر و فعالیت تلومراز در روند پیر شدن

جفت نقش مهمی ایفا می‌کنند. فرض بر این است که با پیشرفت بارداری، فعالیت تلومراز کاهش یافته و این امر در دوران بارداری طبیعی در پیری جفت نقش دارد و منجر به آپوپتوز جفت می‌شود (۶). یافته‌های اخیر نشان داده‌اند که با وجود ساختارهای هتروکروماتینی تلومر، تلومرهای یوکاریوت‌ها به RNA حاوی تکرار تلومری رونویسی می‌شوند (۷، ۸). RNA حاوی تکرار تلومری یک RNA غیر کد کننده بلند^۳ می‌باشد که در انسان، جانوران، قارچ‌ها، پرندگان و تریپانوزوم شناسایی شده است و TERRA جزء جدایی‌ناپذیر هتروکروماتین تلومر می‌باشد (۵، ۷). رونویسی از روی RNA حاوی تکرار تلومری در تمام انتهای کروموزومی انجام می‌شود و این فرآیند با فاکتورهای مراقبتی RNA تنظیم می‌شود. این رونویسی در پاسخ به تغییر طول تلومر انجام می‌شود (۷). TERRA از نواحی زیر تلومری تا انتهای کروموزوم رونویسی شده و جهت رونویسی در آن از سمت سانترومر به سمت تلومر می‌باشد (۸). سنتز TERRA در پستانداران و مخمر توسط RNA پلی‌مراز II انجام می‌شود (۹، ۱۰). تغییرات در بیان سطح TERRA با تغییر طول تلومر، ترویج ناپایداری ژنوم و پیری سلول در ارتباط است؛ به طوری که بیان غیرطبیعی TERRA منجر به پیری زودرس می‌شود. TERRA در عملکردهای تنظیمی متفاوتی نظیر فعالیت تلومراز، هتروکروماتینی شدن تلومرها، توسعه و تمایز سلولی شرکت دارد (۴). از طرفی کاهش بیان TERRA با فعالیت تلومراز مرتبط بوده و می‌تواند نشانگر عملکرد مهارتی TERRA بر روی تلومراز باشد (۱۱-۷).

بر اساس نتایج برخی مطالعات، با تجزیه و تحلیل سیتوتروفوبلاست جفت فرد مبتلا به پره‌اکلامپسی، طول تلومرها کوتاه‌تر و تعداد کپی غیرطبیعی ژن TERC و همچنین کاهش بیان hTERT گزارش شده است (۱۲-۱۴). افزایش سطح hTERT-mRNA جفت در پره‌اکلامپسی اگر با تلومرهای طولانی‌تر در نتیجه فعالیت افزایش تلومراز همراه نباشد، نشان داده شده که با اختلال قابل تصور در

^۱ large non coding RNA (lnc RNA)

^۲ Telomeric repeat-containing RNA (TERRA)

فرآیندهای ترجمه یا پس از ترجمه برخی آنزیم‌ها همراه است (۱، ۱۳). بر اساس نتایج مطالعات، کوتاهی تلومرها ممکن است با ایجاد اختلال در عملکرد جفت موجب پره‌اکلامپسی و محدودیت رشد جنین گردد. پاتوژنز پره‌اکلامپسی و محدودیت رشد داخل رحمی شامل استرس هیپوکسیک است (۵، ۱۴). به دلیل روند رو به افزایش پره‌اکلامپسی در جوامع مدرن و عوارض متعدد پره‌اکلامپسی برای مادر و جنین، تشخیص، درمان و پیشگیری از بروز آن اهمیت زیادی دارد (۱۵)، لذا مطالعه حاضر با هدف مقایسه سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر در نمونه جفت زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی و زنان باردار سالم انجام شد.

روش کار

این مطالعه مورد - شاهدهی بعد از تصویب در کمیته اخلاق با کد اخلاق ۱۳۹۶،۲۲۲.ir.arums.rec مورخ ۹۶/۱۱/۸ دانشگاه علوم پزشکی اردبیل در سال ۹۷-۱۳۹۶ بر روی ۵۰ نفر از مادران باردار مراجعه‌کننده به بیمارستان علوی اردبیل انجام شد. حجم نمونه بر اساس مطالعات قبلی و با در نظر گرفتن خطای نوع اول ۰/۰۵ و توان آزمون ۰/۸۰، برای هر گروه ۲۵ نفر

محاسبه شد. نمونه‌گیری به روش در دسترس انجام شد. ۲۵ زن باردار با تشخیص قطعی پره‌اکلامپسی در گروه مورد و ۲۵ زن باردار سالم در گروه شاهد به صورت هدفمند وارد مطالعه شدند. معیار ورود به مطالعه شامل: مادران مبتلا به پره‌اکلامپسی (افزایش فشارخون بعد از هفته ۲۰ حاملگی همراه با پروتئینوری) و معیارهای خروج از مطالعه شامل: بیماری‌های مادر از قبیل دیابت، نارسایی کلیه، بیماری قلبی، وجود عوارض بارداری مانند لیگوهیدروآمینوس، تأخیر رشد داخل رحمی جنین، کوریوآمیونیوت و جنین مکنونی بود. از این مادران در حین زایمان نمونه جفت به ابعاد ۲×۲×۲ سانتی‌متر تهیه و جهت آنالیز و استخراج RNA به آزمایشگاه ژنتیک ارسال و ارتباط سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر در دو گروه شاهد و کنترل بررسی گردید.

در این مطالعه از پرایمر ۳۶B۴ به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. بعد از طراحی پرایمرها همگی از نظر اختصاصیت blast شدند (جدول ۱).

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در روش Realtime PCR

TERRA-F CGGTTTGTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT	۷۹
TERRA-R GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT	۷۴
۳۶B۴-F CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	
۳۶B۴-R CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	

شد. مایع رویی دور ریخته و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ به آن اضافه گردید. مدت کوتاهی هم‌زدن^۱ انجام شد و به مدت ۵ دقیقه در دور ۷۵۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. بعد از دور ریختن مایع رویی، نمونه در دمای اتاق ۱۰-۵ دقیقه خشک شد. سپس ۵۰ میکرولیتر آب فاقد آنزیم تجزیه‌کننده RNA اضافه گردید و داخل بلوک گرمایی ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه قرار گرفت.

جهت استخراج RNA، یک سی‌سی از Trizol با ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه خرد شده مخلوط و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد و سپس ۰/۲ میلی‌لیتر کلروفورم به آن اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. فاز آبی جدا و در میکروتیوب دیگری (برای استخراج RNA) قرار گرفت. در ادامه برای استخراج، ۰/۵ میلی‌لیتر RNA ایزوپروپانول به فاز آبی اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ در ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ

^۱ Vortex

گرفتند و یک بار در $1 \times \text{TAE}$ غوطه‌ور شدند. ژل‌ها به مدت ۱ ساعت در ۱۰۰ ولت ران شدند. قطعات DNA تحت نور ماوراء بنفش ظاهر شدند. اندازه هر قطعه با مقایسه با نشانگرهای مولکولی DNA مورد بررسی قرار گرفت.

جهت ساخت cDNA برای RNA، RNA استخراج شده از فریزر -80°C بیرون آورده شد و یکسان‌سازی غلظت برای آنها صورت گرفت. غلظت مورد نیاز از RNA برای سنتز cDNA طبق دستورالعمل کیت Vivantis ۱-۱۰ میکروگرم بود. تمامی مراحل سنتز cDNA روی یخ در میکروتیوب‌های فاقد آنزیم نوکلئاز انجام شد. برای ساخت cDNA از جدول زیر استفاده شد (جدول ۲).

جهت بررسی خلوص و غلظت RNAهای استخراج شده، چگالی نوری^۱ آنها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Biotek Epoch Nanodrop) در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

جهت استخراج DNA، 0.3 میلی‌لیتر اتانول 100% به میکروتیوب حاوی DNA و پروتئین اضافه شد و به مدت ۲-۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و به آرامی میکروتیوب سر و ته شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور 2000 و دمای 4°C درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. 1 میلی‌لیتر سدیم سیترات 0.1 مولار در اتانول 10% به میکروتیوب اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و به آرامی گهگاه سر و ته شده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دور 2000 و دمای 4°C درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته و این مرحله دوباره تکرار گردید. سپس 2 میلی‌لیتر اتانول 75% اضافه شد و 15 دقیقه در دور 2000 و دمای 4°C درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته و در دمای اتاق $10-5$ دقیقه نمونه خشک شد. سپس 0.6 میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید 8 میلی‌مولار اضافه گردید و پی‌بتینگ انجام شد. برای خارج نمودن مواد جامد اضافی از محلول 10 دقیقه در دور 12000 و دمای 4°C درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و مواد رویی به میکروتیوب $1/5$ سی‌سی جدید ریخته شد.

اندازه‌گیری DNA با بررسی جذب یک رقیق کردن $1:40$ نمونه در 260 نانومتر انجام شد. چگالی نوری از 1 واحد به 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر DNA دو رشته متصل شد. غلظت نمونه با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید.

$$\text{Sample concentration} = \text{OD } 260 \times \text{dilution factor } (40) \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

جهت الکتروفورز ژل آگارز DNA، DNAهای غوطه‌ور شده با استفاده از الکتروفورز ژل مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ها در بافر بارگیری DNA رقیق شدند. 2% جرم بر حجم ژل آگارز با مخلوط کردن آگارز با بافر $1 \times \text{TAE}$ تهیه شد. ژل‌ها در مخزن ژل افقی قرار

^۱ OD

جدول ۲- شرایط ساخت cDNA

Total RNA	۱-۱۰ میکروگرم
18 Oligo d (T) (۴۰ میکرومول)	۱ میکرولیتر
10 mM dNTP Mix	۱ میکرولیتر
Nuclease Free Water	Top up to ۱۰ میکرولیتر

بعد از همزدن و چرخش سریع مواد (RNA + مخلوط پرایمر تهیه شده) در دمای ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. سپس سریعاً نمونه ۲ دقیقه داخل یخ قرار گرفت. cDNA Syntesis Mixture طبق جدول زیر تهیه شد (جدول ۳).

جدول ۳- شرایط ساخت cDNA synthesis mixture

10 X Buffer-M-Mul V	۲ میکرولیتر
M-Mul V Reverse Trans Criptase	۱۰۰ واحد
Nuclease Free Water	Top up to ۱۰ میکرولیتر

(Annealing) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و در مرحله آخر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵۰ ثانیه انجام شد. با استفاده از رنگ سایبرگرین، میزان تکثیر در هر چرخه دنبال شد. جهت نرمالیزه کردن نتایج حاصل از Real Time PCR از روش $2^{-\Delta CT}$ استفاده شد. در PCR از استاندارد MIQE استفاده شد.

اندازه‌گیری طول تلومر

Telomere Real time PCR

در اکثر اسناد، طول تلومر با تکنیک (PCR) real time (qPCR) که اولین بار توسط ریچارد کوتون (۲۰۰۲) شناسایی شد، مورد بررسی قرار می‌گیرد. این روش از یک طرح اولیه استفاده می‌کند که احتمال ایجاد محصولات پرایمر دایمر را کاهش می‌دهد. ژن تک سلولی ۳۶B۴ انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد تا قادر به نرمال شدن بارگذاری DNA باشد (۱۹) (جدول ۴).

مخلوط پرایمر RNA و مخلوط سنتز cDNA با هم مخلوط و همزده و چرخش سریع انجام شد. میکروتیوب‌ها ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه و ۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه قرار گرفتند. cDNAهای سنتز شده به فریزر ۸۰- انتقال داده شدند.

مراحل انجام Real Time PCR

برای به‌دست آوردن غلظت پرایمر از غلظت ۹۰۰-۱۰۰ پیکومول استفاده شد. برای پرایمر TERRA و یک واکنش Real Time نتایج روی ژل آگارز ران شدند. بعد از پیدا کردن غلظت پرایمر، مراحل واکنش Real Time PCR به ترتیب خروج cDNA از فریزر، رقیق‌سازی پرایمر و انجام Real Time PCR انجام گرفت.

واکنش تکثیری برای ۴۰ سیکل بر طبق این الگوی دمایی انجام شد: مرحله اول در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس مرحله بعدی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و آنیل

جدول ۴- توالی Telomere و ۳۶B۴ Primer (غلظت آغازین ۱۰۰nM)

Telo- F	CGGTTTGTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGT
Telo- R	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT
۳۶B۴-F	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
۳۶B۴-R	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

در این مطالعه مخلوط واکنش کل برای multiplex qPCR شامل ۱۰ میکرولیتر از ترکیب اصلی SYBR، ۴ میکرولیتر (تقریباً ۴۰ نانوگرم) نمونه‌های DNA، ۱ میلی‌لیتر primerهای تلومر و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر (H₂O) بود. هر نمونه در سه بار تکرار شد.

الکتروفورز محصولات روی ژل آگارز

در مرحله اول برای راه‌اندازی اولیه آزمایش، نمونه همگی روی ژل آگاروز ران^۱ شدند تا از نظر وجود پرایمر دایمر بررسی شوند. برای این منظور ۲ گرم از پودر آگارز در یک ارلن شسته شده با آب مقطر ریخته و در ۲۰ میلی‌لیتر بافر TAE ۱X به کمک حرارت حل شد. ۰/۷ میکرولیتر Robust اضافه کرده و بعد از کمی هم زدن، محلول در قالب ژل ریخته و سپس جهت ایجاد چاهک شانه‌ها در محل مورد نظر قرار گرفتند تا ژل پلیمریزه شود. پس از آن شانه‌ها برداشته شده و ژل در تانک مخصوص الکتروفورز حاوی بافر TAE ۱X قرار گرفت. سپس حدود ۲ میکرولیتر بافر راه‌اندازی را با ۵ میکرولیتر محصول PCR مخلوط کرده و با استفاده از سمپلر به درون چاهک ژل الکتروفورز منتقل شد. دستگاه مولد برق بر روی ولتاژ ۸۰-۱۰۰ ولت تنظیم شد و از الکتروفورز ژل از تانک خارج شده و با استفاده از نور UV بررسی گردید.

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون تی مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین سنی کل افراد مورد مطالعه ۲۴/۹۲±۳/۶ سال (در گروه مورد ۲۴/۸±۳/۵ و در گروه شاهد ۲۵±۳/۹) بود. کمترین و بیشترین سن افراد مورد مطالعه به ترتیب ۱۹ و ۳۲ سال بود. بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ سن وجود نداشت (p=۰/۸۸).

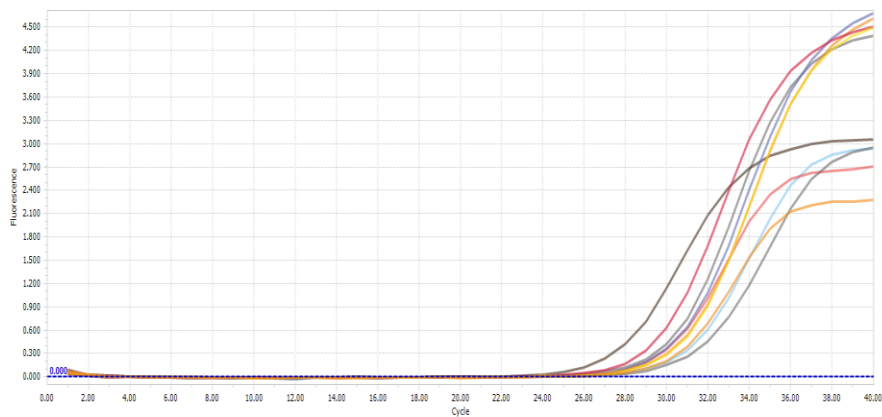
سن بارداری افراد مورد مطالعه ۳۷/۳±۲/۱ هفته (در گروه مورد ۳۵/۷±۱/۱۴ و در گروه شاهد ۳۹±۱/۲) بود. کمترین و بیشترین سن بارداری افراد مورد مطالعه

به ترتیب ۳۳ و ۴۱ هفته بود. بین دو گروه اختلاف معنی‌داری از لحاظ سن بارداری وجود داشت (p=۰/۰۰۱). میانگین شاخص توده بدنی افراد مورد مطالعه ۲۴/۱±۳/۸ (در گروه مورد ۲۶/۶±۳/۲ و در گروه شاهد ۲۱/۵±۲/۳ کیلوگرم بر متر مربع) بود. کمترین و بیشترین شاخص توده بدنی به ترتیب ۱۸/۱ و ۳۲/۱ کیلوگرم بر متر مربع بود. همچنین بر اساس شاخص توده بدنی افراد مورد مطالعه، اکثر افراد (۵۴٪) شاخص توده بدنی بین ۱۸/۵-۲۵ داشتند. بین دو گروه اختلاف معنی‌داری از لحاظ شاخص توده بدنی وجود داشت (p=۰/۰۰۱).

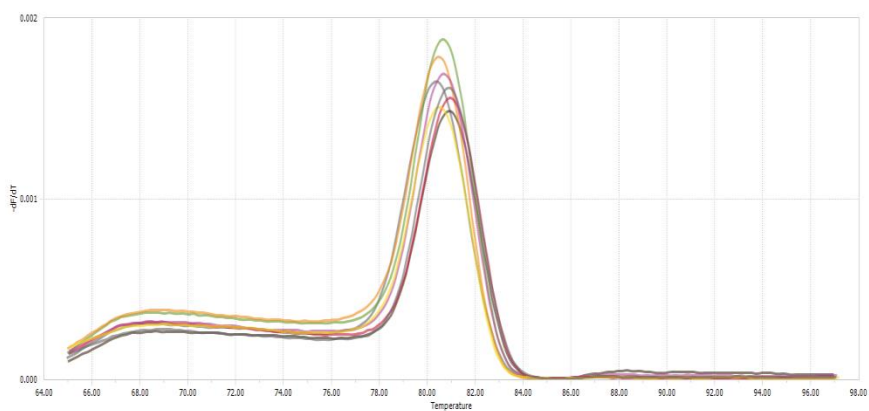
در این مطالعه ۲۱ نفر (۴۲٪) از مادران زایمان سزارین و ۲۹ نفر (۵۸٪) زایمان طبیعی داشتند که در بین گروه‌ها میزان زایمان سزارین در گروه مورد ۶۸٪ و در گروه شاهد ۱۶٪ بود (p=۰/۰۰۱). از نظر جنسیت نوزادان، ۲۷ نوزاد (۵۴٪) پسر و ۲۳ نوزاد (۴۶٪) دختر متولد شدند که بین دو گروه اختلاف معنی‌داری از لحاظ جنسیت نوزادان وجود نداشت (p=۰/۱).

در این مطالعه میانگین به‌دست آمده برای سطح بیان LncRNA TERRA در گروه مورد ۷/۸۷±۱/۹ و در گروه شاهد ۹/۸±۲/۸ بود. کمترین و بیشترین میزان به‌دست آمده به ترتیب در گروه مورد ۱۲/۶ و ۴/۸ و در گروه شاهد ۱۳/۵ و ۴/۲ بود. بر اساس نتایج آزمون تی، اختلاف آماری معنی‌داری از لحاظ سطح بیان LncRNA TERRA بین دو گروه مشاهده شد (p=۰/۰۰۶) (نمودار ۱).

^۱ Run

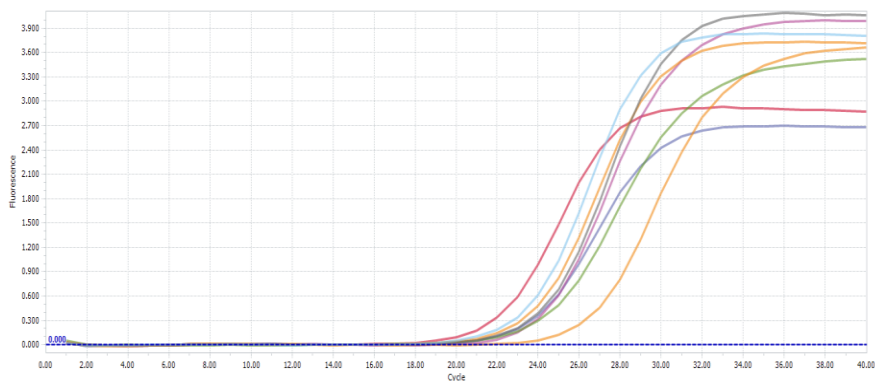


نمودار ۱- نمونه amplification curve های مربوط به ژن Lnc RNA TERRA در نمونه پره‌اکلامپسی و نرمال

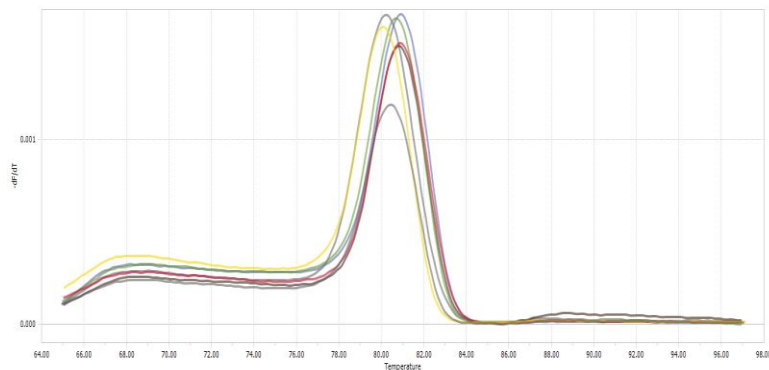


نمودار ۲- نمونه melting curve های مربوط به ژن Lnc RNA TERRA در نمونه‌های پره‌اکلامپسی و نرمال

میانگین به‌دست آمده برای طول تلومر در گروه مورد
 میانگین به‌دست آمده برای طول تلومر در گروه مورد
 ۴/۳۵±۱/۹ و در گروه شاهد ۶/۲±۱/۵۴ بود. کمترین و
 بیشترین میزان به‌دست آمده به‌ترتیب برای گروه مورد
 ۸/۶ و ۱/۳ و برای گروه شاهد ۱۰/۳ و ۴/۱ بود که بر
 اساس نتایج آزمون تی مستقل، بین دو گروه اختلاف
 آماری معنی‌داری از لحاظ طول تلومر وجود داشت
 (p=۰/۰۰۱).



نمودار ۳- نمونه amplification curve های مربوط به طول تلومر در نمونه پره‌اکلامپسی و نرمال



نمودار ۴- نمونه melting curve های مربوط به طول تلومر در نمونه پره‌اکلامپسی و نرمال

بحث

در این مطالعه میانگین سطح بیان LncRNA TERRA در گروه مورد $7/87 \pm 1/9$ و در گروه شاهد $9/8 \pm 2/8$ بود. همچنین در بررسی تفاوت طول تلومر در دو گروه، میانگین به دست آمده برای طول تلومر در گروه مورد $4/35 \pm 1/9$ و در گروه شاهد $6/2 \pm 1/54$ بود. در مطالعه بیرن سنتال و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده شد که طول تلومرهای جفت در پره‌اکلامپسی و محدودیت رشد داخل رحمی کوتاه‌تر هستند (۱۰). ساکنیک هالوی و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان دادند که کوتاه شدن تلومر در تروفوبلاست‌های پره‌اکلامپسی با افزایش پیری سلولی مرتبط می‌باشد و در مکانیسم هموستاز تلومر در چنین مواردی تغییراتی وجود دارد (۵). یافته‌های آنان از نقش تلومرها در پاتوژنز اختلال عملکرد تروفوبلاست‌ها در پره‌اکلامپسی پشتیبانی می‌کند که مطابق یافته‌های مطالعه حاضر است. با این وجود، مطالعه ویلسون و همکاران (۲۰۱۶) با اندازه‌گیری طول تلومر، تفاوت معنی‌داری بین کنترل، ابتلاء به پره‌اکلامپسی زودرس و جفت‌های پره‌اکلامپتیک با شروع دیررس نشان نداد (۱۷). برودی و همکاران (۲۰۱۷) همچنین تفاوت طول تلومر بین جفت طبیعی و جفت در پره‌اکلامپسی را نشان نداد (۱۸). نتایج مطالعه اپیدمیولوژیک جنیفر و همکاران (۲۰۱۵) که به مطالعه درباره اهمیت طول تلومرها و خطر ابتلاء به برخی بیماری‌های شایع پرداختند، نشان داد کوتاه شدن طول تلومرها خطر ابتلاء به بیماری‌های شایع مانند بیماری قلبی - عروقی و برخی سرطان‌ها را

افزایش می‌دهد (۱۹). برودی و همکاران (۲۰۱۷) مطالعه‌ای در مورد پروتئین‌های حفاظت‌کننده از طول تلومر در سه ماهه سوم حاملگی در جفت بیماران مبتلا به پره‌اکلامپسی انجام دادند. نتایج مطالعه آنان نشان داد در بیماران پره‌اکلامپسی در ابتدا پروتئین‌های حفاظت‌کننده سلولی به‌طور بارزی افزایش یافته، ولی در نهایت به دلیل عدم کفایت سیستم میتوکندریال در سلول‌های تروفوبلاست آسیب دیده، مقدار این پروتئین‌ها کاهش یافته و از کارایی مناسب در جلوگیری از کوتاه شدن طول تلومر و آپتوز سلولی برخوردار نمی‌باشند (۱۸). در مطالعه ساکنیک هالوی و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی تأثیر کوتاهی طول تلومر در تروفوبلاست جفت بیماران مبتلا به پره‌اکلامپسی، نقش تلومر در پاتوژنز اختلال تروفوبلاستیک در پره‌اکلامپسی تأیید شد. در این مطالعه کوتاه شدن طول تلومر با تغییر مکانیسم هموستاز در بیماران پره‌اکلامپسی، باعث بروز اختلالات جفتی شد (۵). هالوز و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی نقش طول تلومر در ایجاد بیماری‌ها از دوران جنینی تا بزرگسالی پرداختند. نتایج مطالعه آنها بیان‌کننده پیش‌آگهی ضعیف در حوادث منجر به آغاز پیری زودرس سلول در دوران جنینی و افزایش خطر بروز بیماری در بزرگسالی بود. کاهش طول تلومر به‌عنوان نشانه‌ای از پیری سلولی در بسیاری از مطالعات در مورد شروع زودرس بیماری‌های کاردیوواسکولار، دیابت و غیره در بزرگسالانی که در دوران جنینی در معرض استرس اکسیداتیو قرار گرفته بودند، یافت شد (۱۹). لندراپ (۲۰۰۹) فعالیت تلومر در همراهی با

افزایش شاخص توده بدنی و خطر ابتلاء به پره‌اکلامپسی و فشارخون ناشی از بارداری مشاهده شد (۲۴).

در این مطالعه میزان زایمان سزارین در گروه مورد ۶۸٪ و در گروه شاهد ۱۶٪ بود. با توجه به این که پره‌اکلامپسی با عوارض و مرگ‌ومیر بالای مادر و جنین همراه است، دلیل بالا بودن سزارین در گروه مورد می‌تواند به دلیل انجام سزارین انتخابی یا اورژانسی برای ختم بارداری با توجه به وخامت بیماری باشد. در برخی مطالعات نیز اختلاف معنی‌داری به نفع سزارین انتخابی در بیماران مبتلا به پره‌اکلامپسی مشاهده شد و شایع‌ترین روش زایمان برای زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی، سزارین انتخابی گزارش شده است (۲۵). در این مطالعه از نظر جنسیت نوزادان بین دو گروه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در مطالعه برندی و همکاران (۲۰۱۸) پره‌اکلامپسی زودرس با جنین دختر بیشتر مشاهده شد (۲۶). در مطالعه جاسکولیکا و همکاران (۲۰۱۷) بین پره‌اکلامپسی/اکلامپسی و جنین پسر در جمعیت‌های غیرآسیایی ارتباط وجود داشت (۲۷).

در این مطالعه بین میانگین سنی مادران، سن بارداری، جنسیت نوزادان و سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر ارتباطی مشاهده نشد. با توجه به اینکه مطالعات مربوط به بررسی نقش LncRNA TERRA و تلومر در مادران مبتلا به پره‌اکلامپسی بسیار محدود بود، لذا سعی بر این شد که از نتایج مطالعات انجام یافته در خصوص سایر بیماری‌ها نیز استفاده گردد. از نظر ملاحظات اخلاقی، توضیحات کافی برای همه بیماران در این مطالعه داده شد. در طول انجام مطالعه هیچ‌گونه داروی اضافی یا مضر به بیماران تجویز نگردید. از بیماران هیچ هزینه‌ای در ارتباط با این مطالعه اخذ نگردید. محدودیت در بیماریابی، محدودیت‌های مالی جهت انتخاب جامعه آماری بزرگ‌تر و لزوم انتقال سریع نمونه‌ها به آزمایشگاه، از محدودیت‌های مطالعه حاضر بود.

نتیجه‌گیری

استرس‌های اکسیداتیو (از جمله پره‌اکلامپسی) را بررسی کرد. نتایج حاصل مطرح‌کننده تسریع در کوتاه شدن طول تلومر در طی استرس‌های اکسیداتیو بود. همچنین بیان نمود که در جریان پره‌اکلامپسی نیز به دلیل کاهش پرفیوزن جفتی و هیپوکسی به دنبال کوتاهی طول تلومر آپتوز سلولی رخ می‌دهد (۲۱).

مطالعه ژانگ و همکاران (۲۰۱۸) نشان داد بیان LncRNA در بیماری پره‌اکلامپسی کاهش می‌یابد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (۲۲). لیو و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی نقش LncRNA در پرولیفراسیون سلول‌های تروفوبلاست جفت پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که با کاهش سطح بیان LncRNA در پره‌اکلامپسی، مهاجرت و پرولیفراسیون سلول‌های تروفوبلاست و تشکیل عروق خونی مارپیچی جفت دچار اختلال می‌شود (۲۳). با توجه به نتایج مطالعات، تغییر در بیان ژن، جزء اولین وقایع در پاتوژنز و پیشرفت بیماری‌ها از جمله پره‌اکلامپسی می‌باشد. تنظیم‌کننده‌های بیان ژن در بیماری پره‌اکلامپسی دخیل می‌باشند و LncRNA TERRA به‌عنوان تنظیم‌کننده شبکه تنظیمی بیان ژن طبقه‌بندی شده است و این ریز تنظیم‌کننده، نقش اساسی در پاتوژنز بیماری پره‌اکلامپسی دارد (۲۲، ۲۳). در مطالعه حاضر سن بارداری بین دو گروه اختلاف معنی‌داری داشت؛ به طوری که در گروه پره‌اکلامپسی کمتر بود که این یافته به دلیل ختم زودتر از موعد بارداری با توجه به شدت بیماری یا شروع خودبه‌خود زایمان در افراد مبتلا به پره‌اکلامپسی قابل انتظار است.

در این مطالعه میانگین شاخص توده بدنی در زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی بالا بود. مطالعات زیادی در مورد ارتباط پره‌اکلامپسی و چاقی انجام شده است. مشابه چگونگی افزایش روند پره‌اکلامپسی در طی ۲۵ سال گذشته، شیوع چاقی نیز افزایش نشان می‌دهد. مطالعات بی‌شماری نشان داده‌اند که چاقی موجب افزایش عوارض بارداری از جمله افزایش فشارخون می‌شود؛ به طوری که همسو با مطالعه حاضر، در مطالعه فرناندز آلبا و همکاران (۲۰۱۸) ارتباط مستقیمی بین

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی مادران شرکت کننده در این پژوهش و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تشکر و قدردانی می شود.

سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر در مادران باردار مبتلا به پره‌اکلامپسی نسبت به گروه کنترل پایین تر بود، بنابراین به نظر می رسد می توان از دو معیار سطح بیان LncRNA TERRA و طول تلومر در پیش بینی و تشخیص پره‌اکلامپسی استفاده نمود.

منابع

۱. Jirkovská M, Korabečná M, Laššáková S. Telomeres and Telomerase Activity in the Human Placenta. Open access peer-reviewed chapter - ONLINE FIRS. October ۲۲nd ۲۰۱۹. IntechOpen, DOI: ۱۰.۵۷۷۲/intechopen.۸۶۳۲۷. Available at: <https://www.intechopen.com/online-first/telomeres-and-telomerase-activity-in-the-human-placenta>.
۲. Cunningham FG, Leveno KJ, Bloom SL, Dash JS, Spong CY, Hoffman BL, et al. Williams Obstetrics. ۲۵nd ed. New York: McGraw-Hill; ۲۰۱۸.
۳. De Lange T. How Telomeres Solve the End-Protection Problem. Science ۲۰۰۹; ۳۲۶(۵۹۵۵):۹۴۸-۵۲.
۴. Wang C, Zhao L, Lu S. Role of TERRA in the regulation of telomere length. Int J Biol Sci ۲۰۱۵; ۱۱(۳):۳۱۶-۲۳.
۵. Sukenik-Halevy R, Amiel A, Kidron D, Liberman M, Ganor-Paz Y, Biron-Shental T. Telomere homeostasis in trophoblasts and in cord blood cells from pregnancies complicated with preeclampsia. Am J Obstet Gynecol ۲۰۱۶; ۲۱۴(۲):۲۸۳.e۱-۲۸۳.e۷.
۶. Sukenik-Halevy R, Fejgin M, Kidron D, Goldberg-Bittman L, Sharony R, Biron-Shental T, et al. Telomere aggregate formation in placenta specimens of pregnancies complicated with pre-eclampsia. Cancer Genet Cytogenet ۲۰۰۹; ۱۹۵(۱):۲۷-۳۰.
۷. Luke B, Lingner J. TERRA: telomeric repeat-containing RNA. EMBO J ۲۰۰۹; ۲۸(۱۷):۲۵۰۳-۱۰.
۸. Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. Science ۲۰۰۷; ۳۱۸(۵۸۵۱):۷۹۸-۸۰۱.
۹. Feuerhahn S, Iglesias N, Panza A, Porro A, Lingner J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. FEBS Lett ۲۰۱۰; ۵۸۴(۱۷):۳۸۱۲-۸.
۱۰. Schoeftner S, Blasco MA, editors. Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. Semin Cell Dev Biol ۲۰۱۰; ۲۱(۲):۱۸۶-۹۳.
۱۱. Ng LJ, Cropley JE, Pickett HA, Reddel RR, Suter CM. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription. Nucleic Acids Res ۲۰۰۹; ۳۷(۴):۱۱۵۲-۱۱۵۹.
۱۲. Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Goldberg-Bittman L, Kidron D, Fejgin MD, et al. Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol ۲۰۱۰; ۲۰۲(۴):۳۸۱.e۱-۷.
۱۳. Dargahi R, Shabbazzadegan S, Naghizadeh-Baghi A, Sefati Kooyakhi, S. Expression levels of Drosha and Dicer enzymes and DGCR¹ protein in pre-eclamptic patients. Iran J Obstet Gynecol Infertil ۲۰۱۸; ۲۰(۱۲):۴۰-۴۹.
۱۴. Biron-Shental T, Sukenik-Halevy R, Sharon Y, Goldberg-Bittman L, Kidron D, Fejgin MD, et al. Short telomeres may play a role in placental dysfunction in preeclampsia and intrauterine growth restriction. Am J Obstet Gynecol ۲۰۱۰; ۲۰۲(۴):۳۸۱.e۱-۷.
۱۵. Arias-Sosa LA. Understanding the Role of Telomere Dynamics in Normal and Dysfunctional Human Reproduction. Reprod ۲۰۱۹; ۲۶(۱):۶-۱۷.
۱۶. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res ۲۰۰۲; ۳۰(۱۰):e۴۷.
۱۷. Wilson SL, Liu Y, Robinson WP. Placental telomere length decline with gestational age differs by sex and TERT, DNMT¹, and DNMT^{3A} DNA methylation. Placenta ۲۰۱۶; ۴۸:۲۶-۳۳.
۱۸. Broady AJ, Loichinger MH, Ahn HJ, Davy PM, Allsop RC, Bryant-Greenwood GD. Protective proteins and telomere length in placentas from patients with pre-eclampsia in the last trimester of gestation. Placenta ۲۰۱۷; ۵۰:۴۴-۵۲.
۱۹. Barrett JH, Iles MM, Dunning AM, Pooley KA. Telomere length and common disease: study design and analytical challenges. Hum Genet ۲۰۱۵; ۱۳۴(۷):۶۷۹-۸۹.
۲۰. Hallows SE, Regnault TR, Betts DH. The long and short of it: the role of telomeres in fetal origins of adult disease. J Pregnancy ۲۰۱۲; ۲۰۱۲:۶۳۸۴۷۶.
۲۱. Lansdorp PM. Telomeres and disease. EMBO J ۲۰۰۹; ۲۸(۱۷):۲۵۳۲-۲۵۴۰.
۲۲. Pengjie Z, Xionghui C, Yueming Z, Ting X, Na L, Jianying T, et al. LncRNA uc۰۰۳fir promotes CCL^۵ expression and negatively affects proliferation and migration of trophoblast cells in preeclampsia. Pregnancy Hypertension ۲۰۱۸; ۱۴:۹۰-۶.

۲۳. Liu X, Chen H, Kong W, Zhang Y, Cao L, Gao L, et al. Down-regulated long non-coding RNA-ATB in preeclampsia and its effect on suppressing migration, proliferation, and tube formation of trophoblast cells. *Placenta* ۲۰۱۷; ۴۹:۸۰-۸۷.
۲۴. Fernández Alba JJ, Mesa Páez C, Vilar Sánchez Á, Soto Pazos E, González Macías MDC, Serrano Negro E, et al. Overweight and obesity at risk factors for hypertensive states of pregnancy: a retrospective cohort study. *Nutr Hosp* ۲۰۱۸; ۳۵(۴):۸۷۴-۸۸۰.
۲۵. Pacher J, Brix E, Lehner R. The mode of delivery in patients with preeclampsia at term subject to elective or emergency Cesarean section. *Arch Gynecol Obstet* ۲۰۱۴; ۲۸۹(۲):۲۶۳-۷.
۲۶. Taylor BD, Ness RB, Klebanoff MA, Tang G, Roberts JM, Hougaard DM, et al. The impact of female fetal sex on preeclampsia and the maternal immune milieu. *Pregnancy Hypertens* ۲۰۱۸; ۱۲:۵۳-۵۷.
۲۷. Jaskolka D, Retnakaran R, Zinman B, Kramer CK. Fetal sex and maternal risk of pre-eclampsia/eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* ۲۰۱۷; ۱۲۴(۴):۵۵۳-۵۶۰.