

بررسی بیان ژن *CYFIP1* در خون بند ناف نوزادان و ارتباط آن با شاخص توده بدنی مادر

مهسا اسکندری^۱، دکتر الهام حسینی^{۲،۳*}، دکتر زهرا زندیه^۵، احسان نوری^۶، راحله کفایی نژاد^۷، دکتر منصور صادق زاده^۸، دکتر علی اوسط ملتی^۹

۱. دانشجوی دکترای تخصصی بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
۲. دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳. استادیار گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک زنجان، زنجان، ایران.
۵. استادیار گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
۶. کارشناس ارشد گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
۷. کارشناس گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران.
۸. استاد گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
۹. استاد گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴

خلاصه

مقدمه: مطالعه حاضر با هدف بررسی بیان ژن *CYFIP1* در خون بند ناف (UCB) نوزادان و ارتباط احتمالی آن با دسته‌های مختلف شاخص توده بدنی مادر قبل از بارداری، پروفایل لیپیدی، وزن هنگام تولد و وضعیت نوزاد برای سن حاملگی انجام شد.

روش کار: این مطالعه مقطعی، از سال ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ بر روی خون بند ناف ۱۱۸ نوزاد پسر از بیمارستان موسوی و بیمارستان بهمن شهر زنجان انجام گرفت. زنان بر اساس BMI قبل از بارداری به سه گروه شاخص توده بدنی طبیعی، دارای اضافه وزن و چاق تقسیم شدند. هر نمونه UCB به دو قسمت تقسیم گردید. بخشی جهت بررسی پروفایل لیپیدی شامل لیپوپروتئین با چگالی کم، تری‌گلیسیرید، کلسترول تام و لیپوپروتئین با چگالی بالا استفاده گردید. استخراج mRNA سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی جهت بررسی بیان ژن *CYFIP1* انجام گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) و آزمون همبستگی پیرسون انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بیان ژن *CYFIP1* در خون بند ناف نوزادان مادران دارای اضافه‌وزن و چاق بیشتر از زنان با وزن طبیعی بود ($p=۰/۰۰۱$). در UCB مادران در رده چاق، سطوح کلسترول و LDL نسبت به مادران با وزن طبیعی و اضافه وزن افزایش معنی‌داری نشان داد ($p=۰/۰۰۱$). همبستگی مثبتی بین BMI مادر قبل از بارداری و بیان ژن *CYFIP1* خون بند ناف ($r=۰/۳۳۳$ ، $p=۰/۰۰۱$)، کلسترول ($r=۰/۵۲۰$ ، $p=۰/۰۰۰۱$)، تری‌گلیسیرید ($r=۰/۲۹۰$ ، $p=۰/۰۰۱$)، سطح LDL ($r=۰/۳۹۷$ ، $p=۰/۰۰۰۱$) و وزن نوزاد در هنگام تولد بر اساس جنس و سن حاملگی ($r=۰/۲۶۲$ ، $p=۰/۰۰۱$) وجود داشت.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن *CYFIP1* در گروه‌های مختلف BMI قبل از بارداری مادر و پروفایل لیپیدی همبستگی مثبت دارد که نشان می‌دهد عوامل خطری که در افزایش BMI نقش دارند، با توجه به نقش ژن *CYFIP1* در تکامل مغز، ممکن است بتواند پیامدهای منفی بر سلامت و رشد جنین ایجاد کنند.

کلمات کلیدی: اختلال طیف اوتیسم، پروتئین ۱ در تعامل سیتوپلاسمی FMR1، شاخص توده بدنی، *CYFIP1*

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر الهام حسینی؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران. تلفن: ۰۲۴-۳۳۱۳۱۲۳۸؛ پست الکترونیک:

elhamhosseinid@gmail.com

مقدمه

بر اساس گزارش مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری (CDC)^۱، از هر ۵۴ کودک، یک کودک مبتلا به اختلال طیف اوتیسم (ASD)^۲ است و در دهه گذشته میزان شیوع آن به طور چشمگیری افزایش یافته است. این بیماری با سه اختلال اصلی پایدار در تعامل اجتماعی، اختلال کیفی در ارتباطات و الگوهای رفتاری، علایق یا فعالیت‌های محدود، تکراری و کلیشه‌ای مشخص می‌شود (۱). این بیماری در پسران حدود ۳-۴ برابر بیشتر از دختران و معمولاً در اوایل زندگی و اغلب قبل از سن ۳ سالگی بروز می‌کند (۲)، بررسی عوامل ایجاد کننده این اختلال نشان داده است که ASD، یک بیماری چندعاملی است و ناشی از تعامل پیچیده بین عامل اصلی ژنتیک و عوامل خطر محیطی، به ویژه سبک زندگی مادر، سن بالای والدین، وجود چاقی در والدین، ابتلاء مادر به دیابت، بیماری‌های متابولیک و یا عفونت در زمان بارداری، قرار گرفتن در معرض آلودگی هوا، مواد شیمیایی و سموم محیطی و کم‌کاری تیروئید مادر در دوران بارداری است (۴-۶)؛ به بیان دیگر، زمینه ارثی ژنتیکی می‌تواند عوارض جانبی ناشی از عوامل محیطی را افزایش داده و اگر این دو به صورت همگرا عمل کنند، می‌توانند بروز بیماری را تشدید کنند (۷، ۸). این عوامل می‌توانند افزایش میزان بروز ASD در جوامع پیشرفته را توجیه کنند. علی‌رغم این مطالعات، شواهد خاصی در مورد ماهیت این فعل و انفعالات و درک انواع متغیرهای غیرژنتیکی که در دوران بارداری با هم تعامل دارند، وجود ندارد (۶).

از بین عوامل محیطی، هم کمبود وزن مادر و هم چاقی، جزء کاندیداهای ایجاد بیماری می‌باشند و با افزایش بروز ASD همراه هستند (۹، ۱۰). التهاب طولانی‌مدت محیط رحم ناشی از چاقی مادر، سیستم ایمنی مادر را فعال می‌کند و منجر به اختلال در رشد و تمایز سیستم عصبی جنین می‌شود و به ناهنجاری‌های عصبی در فرزند منتهی می‌شود. از سوی دیگر، سوء

تغذیه مادر ممکن است پاسخ استرس فیزیولوژیکی را ایجاد کند که به دلیل تولید بیش از حد مواد پیش‌التهابی منجر به آسیب مغزی شود (۱۰، ۱۱). علاوه بر این، کمبود مواد غذایی مانند اسید فولیک، ویتامین D، آهن و اسید چرب غیراشباع چندگانه (PUFA)^۳، قبل یا در طول بارداری، از عوامل خطر ASD هستند (۱۲).

شناخت عوامل محیطی ایجاد کننده یا تشدید کننده این بیماری، در کنار بررسی‌های ژنتیکی و یافتن مسیرهای درگیر در ASD، می‌تواند تصویری جامع جهت پیشرفت روش‌های تشخیصی زودهنگام و مداخلات درمانی مناسب را ارائه دهد (۶). پروتئین ^۴CYFIP1، بر روی کروموزوم ۱۵ (q11.2) قرار دارد که ناهنجاری‌های ساختاری رایج در این ناحیه، به عنوان یک hot spot برای ASD در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این نشان داده شده است که بیان بیش از حد ^۵CYFIP1، برخی از مسیرهای سیگنالینگ را فعال می‌کند (مانند ^۵mTOR) و باعث نقص مورفولوژیکی عصبی می‌شود که خطر ASD و اوتیسم را افزایش می‌دهد (۱۳، ۱۴). به علاوه، از آنجایی که پروفایل متابولیت پلاسمای بند ناف ممکن است منعکس کننده انتقال متابولیت‌های مادر و وضعیت متابولیک جنین باشد، علاقه فزاینده‌ای به این موضوع وجود دارد که آیا بررسی پروفایل متابولیتی پلاسمای بند ناف می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی، خطر ابتلاء به بیماری در مراحل اولیه زندگی مانند چاقی، بیماری‌های متابولیک و یا رشد عصبی باشند یا خیر (۱۵، ۱۶). اخیراً توجه ویژه‌ای به خون بند ناف به عنوان پنجره‌ای که تغییرات مولکولی خاص در زندگی پری‌ناتال از منظر بررسی خطر ASD را آشکار می‌سازد، شده است و می‌تواند یک ابزار جهت بررسی فوری و منحصر به فرد از این دوران که دوران حیاتی برای رشد عصبی است را ارائه دهد (۱۷).

³ Polyunsaturated fatty acid

⁴ Human cytoplasmic fragile X mental retardation protein (FMRP) interacting protein 1

⁵ Mammalian target of rapamycin

¹ Centers for Disease Control and Prevention

² Autism Spectrum Disorder

سن نوزاد در بدو تولد (استخراج از پرونده پزشکی) با استفاده از تاریخ آخرین سیکل قاعدگی و یا در صورت وجود گزارش سونوگرافی، تخمین زده شد، در غیر این صورت از تصاویر سونوگرافی استفاده شد.

نمونه‌ها بر اساس معیارهای ورود و خروج، از بین بیماران هر دو بیمارستان تا زمان تکمیل حجم نمونه انتخاب شدند. این دو بیمارستان بر اساس دسترسی و اندازه جمعیت بیمار و توزیع شرکت‌کنندگان در بین گروه‌های مورد مطالعه انتخاب شدند. هماهنگی بین تیم تحقیقاتی و کادر پزشکی در هر بیمارستان برای حفظ یکنواختی و اطمینان از داده‌های جمع‌آوری شده انجام گرفت. پرسنل پژوهشی برای پیروی از پروتکل‌های مشابه برای جمع‌آوری نمونه، جابجایی و مستندسازی مشخصات دموگرافیک و ویژگی‌های بالینی بیمار در هر دو بیمارستان آموزش دیدند. در نهایت نمونه‌ها، به آزمایشگاه تحقیقاتی ارجاع داده می‌شدند.

حجم نمونه در هر گروه پس از انجام پایلوت، با استفاده از فرمول تعیین حجم نمونه با احتساب آلفای ۰/۵ و توان آزمون ۰/۸۰، معادل ۳۶ نفر برآورد گردید که در این مطالعه تعداد کل مادران در گروه دارای وزن طبیعی ۳۹ نفر، در گروه دارای اضافه وزن ۴۱ نفر و در گروه چاق، ۳۸ نفر نمونه‌گیری انجام گردید.

شاخص توده بدنی طبیعی به صورت $18.5 \leq BMI < 25$ کیلوگرم بر متر مربع، اضافه وزن $25 \leq BMI < 30$ کیلوگرم بر متر مربع و چاقی با $BMI \geq 30$ کیلوگرم بر متر مربع تعریف گردید.

جمع‌آوری نمونه، استخراج RNA، سنتز cDNA، و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (qRT-PCR)

نمونه‌های خون بند ناف در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه پس از زایمان توسط پرسنل بیمارستان واجد شرایط و آموزش دیده، جمع‌آوری گردید. حدود ۱۵ میلی‌لیتر خون بند ناف بلافاصله به لوله‌های هپارینه شده منتقل گردید، سپس اسناد و نمونه‌های مربوطه در زایشگاه تهیه و در جعبه‌های عایق مخصوص به آزمایشگاه ارسال شد. پروفایل لیپیدی شامل لیپوپروتئین با چگالی کم (LDL)^۲، تری‌گلیسیرید (TG)^۱، کلسترول تام (TC)^۲

لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اینکه آیا سطح بیان ژن CYFIPI در خون بند ناف، با رده‌بندی‌های مختلف شاخص توده بدنی پایه مادر (BMI)، پروفایل لیپیدی، وزن هنگام تولد و وضعیت نوزاد در هنگام تولد بر اساس سن حاملگی (GA)^۱ تغییر می‌کند یا خیر؟، انجام شد.

روش کار

این مطالعه مقطعی تحلیلی پس از تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان (کد تأیید اخلاق: IR.ZUMS.REC.1398.360) از اردیبهشت ۱۳۹۹ تا اردیبهشت ۱۴۰۰ بر روی ۱۱۸ مادر باردار از بیمارستان موسوی و بیمارستان بهمن شهر زنجان انجام گرفت. قبل از مطالعه از تمام شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه کتبی اخذ گردید. معیارهای ورود به مطالعه شامل: مادران باردار دارای جنین پسر تک‌قلو در سنین ۳۵-۱۸ سال با BMI بالاتر یا مساوی ۱۸/۵ کیلوگرم بر متر مربع بود. معیارهای خروج از مطالعه شامل: مادران باردار با کمبود وزن (شاخص توده بدنی کمتر از ۱۸/۵ کیلوگرم بر مترمربع)، بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های التهابی، قلبی، کبدی، سرطان، فشار خون بالا، پره‌اکلامپسی، مصرف دارو، دیابت نوع ۱ و اختلالات تیروئید (کم‌کاری تیروئید یا پرکاری تیروئید)، زایمان زودرس (هفته حاملگی کمتر از ۳۷)، مصرف دخانیات، مادران باردار با جنین دختر، زنان باردار کمتر از ۱۸ سال و استفاده از فناوری‌های کمک باروری یا پروتکل‌های تحریک تخمدانی بود.

پرسشنامه‌ای مربوط به مشخصات عمومی شامل سن، وزن پیش از بارداری، تعداد فرزندان، مصرف داروهای روان‌گردان و آرام‌بخش پیش از بارداری و یا در حین آن و دریافت رژیم غذایی خاص از طریق مصاحبه برای هر فرد تکمیل شد. قد مادران توسط یک ماما اندازه‌گیری شد. وزن قبل از بارداری یا از پرونده‌های پزشکی استخراج شد یا بر اساس گزارش خود مادر ثبت گردید. BMI قبل از بارداری (کیلوگرم بر متر مربع)، به صورت وزن (کیلوگرم) تقسیم بر مجذور قد (متر) محاسبه شد.

² Low-density lipoprotein

¹ Gestational-age

و لیپوپروتئین با چگالی بالا (HDL)^۳ با استفاده از ۵ میلی‌لیتر خون بند ناف در دستگاه اتوآنالیزر (نیما پویس طب، ایران) اندازه‌گیری شد. مشخصات دامنه مرجع هر کدام از پروفایل لیپیدی به شرح ذیل بود: LDL (کیت پارس آزمون، با دامنه مرجع از ۱۳۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان طبیعی و بیشتر از ۱۶۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان غیرطبیعی)، HDL (کیت پارس آزمون، با دامنه مرجع بیشتر یا مساوی ۳۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)، TG (کیت پارس آزمون، با دامنه مرجع کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان طبیعی و بیشتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان غیرطبیعی) و TC (کیت پارس آزمون، با دامنه مرجع کمتر از ۲۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان طبیعی و بیشتر از ۲۴۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان غیرطبیعی).

خالص‌سازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC)^۴ انجام گردید. برای این منظور، در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰ میلی‌لیتر خون نگهداری شده در لوله محتوی هپارین ریخته و هم حجم آن PBS خنک (نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) اضافه شد. با حرکت آرام و دورانی مخلوط‌سازی انجام شد. در دو فالکون ۱۵ میلی‌لیتری، ۳ میلی‌لیتر فایکول خنک (نگهداری شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) ریخته و با سمپلر استریل نیمی از خون رقیق شده بر روی فایکول (بهار افشان، ایران) موجود در هر لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتر اضافه شد. پس از اضافه کردن خون، لوله‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد)، قرار گرفتند (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه، ۴۰ دقیقه). پس از سانتریفیوژ، ۴ لایه قابل تشخیص شامل پلاسما، PBMC، فایکول و گلبول‌های قرمز به‌ترتیب از بالا به پایین مشاهده شد. با استفاده از سرسمپلر، لایه PBMC از هر دو لوله فالکون که مربوط به یک فرد بودند، جدا شده و در دو لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتر ریخته شدند. سپس تا حد ۱۰ میلی‌لیتر بر PBMC

محلول PBS اضافه گردیده و به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شد (۴ درجه سانتی‌گراد، با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه). بعد از سانتریفیوژ، لایه رویی را دور ریخته و به سلول‌های چسبیده در ته فالکون، ۲ میلی‌لیتر محلول PBS اضافه کرده و با پیپتاژ کردن لایه سلولی را در محلول حل و یک دست کرده و در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و مجدداً سانتریفیوژ انجام شد (۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه). سپس محلول رویی دور ریخته شده و PBMC برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج RNA پس از جداسازی PBMC و با استفاده از کیت استخراج RNX-plus (Sinaclon,) (Cat.NO: EX6101 Iran, بر روی باقی‌مانده هر نمونه (۱۰ میلی‌لیتر) طبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. به‌طور خلاصه هر یک از نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر محلول RNX-plus که در واقع همان ترايزول می‌باشد، مخلوط و هموژن شد. این مخلوط ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه شد، مجدداً ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس سانتریفیوژ شد. دور سانتریفیوژ ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، مدت زمان ۱۵ دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. سپس از محلول شفاف رویی ۴۰۰ میکرولیتر برداشته و در یک میکروتیوب جدید به آن ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول افزوده شد و ۱۵ دقیقه در فریزر قرار داده شد و مجدداً با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، مدت زمان ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل، اتانول سرد ۷۵٪ اضافه شد. مجدداً تکان داده تا مخلوط شدند و با ۷۵۰۰ دور در دقیقه، مدت زمان ۸ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از خشک شدن ۵۰ میکرولیتر آب DEPC به پلیت در میکروتیوب اضافه شد و ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه انکوبه گردید.

جهت تعیین غلظت RNA از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, USA) استفاده شد. برای اطمینان از خلوص RNA، الکتروفورز با ژل آگارز

¹ Triglyceride

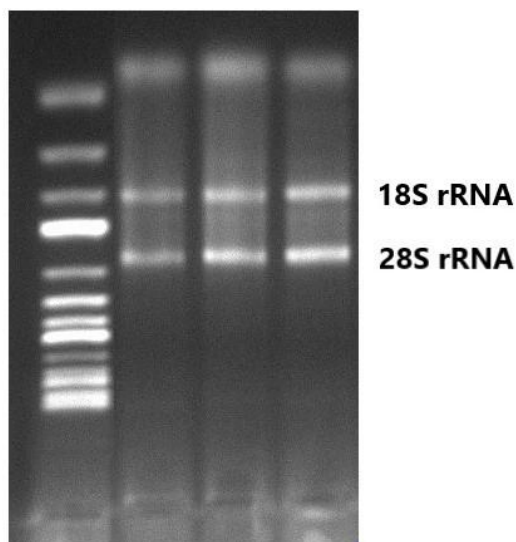
² Total cholesterol

³ High-density lipoprotein

⁴ Peripheral blood mononuclear cell

۱ DNase (شرکت یکتا تجهیز آزما) تیمار شد. برای این کار بسته به غلظت RNA و حجم کل RNA مورد نیاز برای مراحل بعدی، میزان RNA مورد نیاز برداشته شد. بر اساس میزان RNA کل مورد نیاز، دئوکسی ریبونوکلائز ۱ (DNase I, Cat No:) RNase Inhibitor, DNase buffer, (YT9058) و آب nuclease free به RNA اولیه افزوده شد. سپس ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ترموستات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در ادامه EDTA (۲۵ میکرومولار) جهت توقف واکنش افزوده شده و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون انجام شد.

۱/۵٪ و رنگ اتیدیوم بروماید استفاده گردید. به میزان ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با ۲ میکرولیتر رنگ مخلوط شد؛ از طرفی دیگر ۴ میکرولیتر رنگ با ۶ میکرولیتر از Ladder مخلوط گردید و بر روی ژل آگارز در تانک الکتروفورز بارگذاری و بررسی گردید. زمانی کیفیت RNA مناسب است که باندهای 28S rRNA و 18S rRNA آن کاملاً واضح و مشخص باشد و شدت باند 28S rRNA آن بیشتر از شدت باند 18S rRNA باشد (شکل ۱). RNA استخراج شده تا زمان سنتز cDNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور حذف آلودگی احتمالی RNA با DNA ژنومی، RNA استخراج شده توسط آنزیم



شکل ۱- تصویر مربوط به ژل الکتروفورز برخی از RNAهای استخراج شده

سنتز cDNA با استفاده از کیت 2-step BioFACT (Korea, Cat.NO: BR631-096) طبق دستورالعمل انجام شد. ابتدا به میزان ۱۰ نانوگرم نمونه RNA و ۱ میکرولیتر از مخلوط پرایمر عمومی الیگو dt و Random Hexamer در میکروتیوپ ریخته و سپس ورتکس و اسپین گردید، سپس میکروتیوپ داخل ترموسایکلر قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵۰ درجه برای جلوگیری از واکنش‌های غیراختصاصی انکوبه گردید. سپس در ترموستات دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای اتمام واکنش

سنتز cDNA قرار گرفتند. در نهایت cDNAهای ساخته شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردیدند. سپس ویژگی پرایمرها توسط پایگاه داده NCBI تأیید و بررسی شد. توالی پرایمرهای فوروارد (F)^۱ و معکوس (R)^۲ ژن *CYFIPI* عبارت بودند از:
F:CACTGGGCTGGCTGTATGATC
R:GACTTTAAGTAGATGGTAGCAGA

¹ Forward
² Reverse

به مدت ۱۵ ثانیه و مراحل اتصال و طویل شدن در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) واکنش انجام گردید. بیان نسبی ژن در مقایسه بین گروه‌ها توسط روش ΔC_t و محاسبه $2^{-\Delta\Delta C_t}$ انجام شد. C_t عبارت است از اولین تکثیر معنی‌دار در واکنش PCR، که به آن سیکل آستانه^۳ گفته می‌شود. به‌طور خلاصه محاسبات به این صورت انجام شد که C_t ژن‌های هدف دو بار تکرار در هر نمونه از C_t ژن مرجع در همان نمونه کسر شد و ΔC_t به دست آمد:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Target gene}) - C_t (\text{Reference gene})$$

سپس ΔC_t نمونه‌ها برای هر ژن، از ΔC_t گروه کنترل کسر شده و $\Delta\Delta C_t$ برای هر نمونه حاصل گردید. در نهایت مقادیر $2^{-\Delta\Delta C_t}$ محاسبه گردید. نمای کلی طراحی مطالعه در شکل ۲ نشان داده شده است.

AATCC و GAPDH (به‌عنوان ژن خانه‌داری^۱) (F: GCCGCCTGGAGAGAAACCTGC
R: GGAAGAATGGGAGTTGCTGTTGAA
G).

بعد از استخراج RNA و ساخت cDNA، جهت بررسی کیفیت cDNA ساخته شده و همچنین بررسی پرایمرهای طراحی شده، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)^۲ با پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن انجام شد.

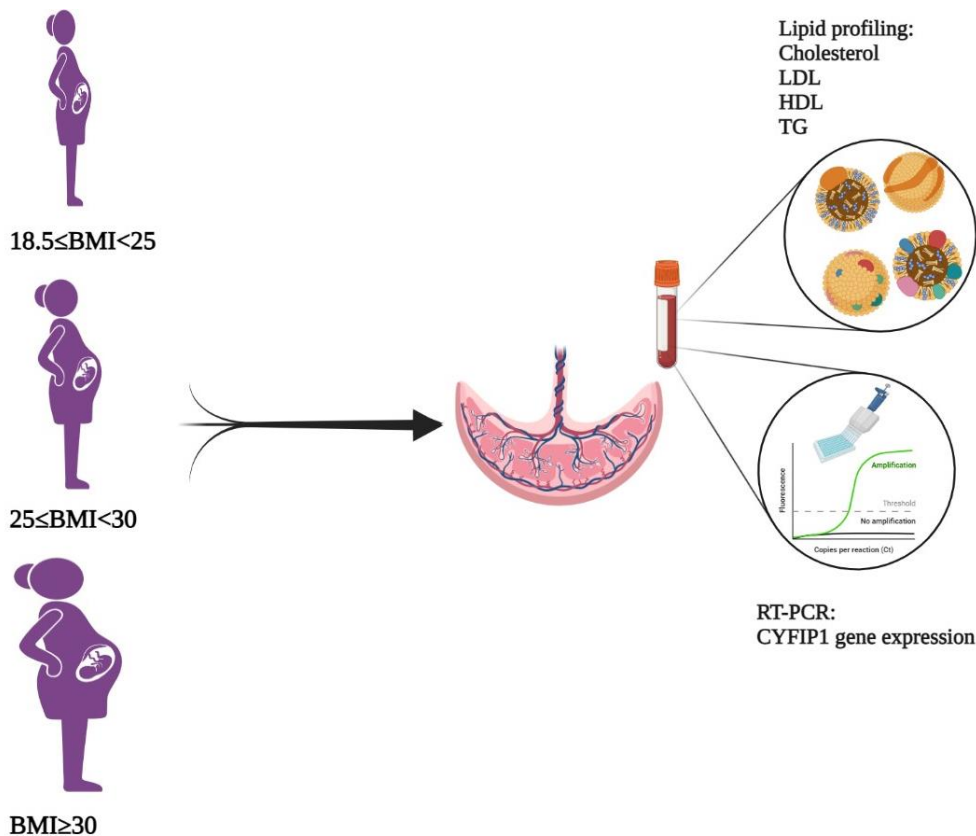
کیت 2-step (Korea, Cat.NO: BR631-096) BioFACT حاوی یک آنزیم DNA پلیمرز مقاوم به دمای بالا، ۴ نوع داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) و یون‌های $MgCl_2$ که فعالیت مورد نیاز آنزیم را در اختیار آن قرار می‌دهند، می‌باشد. تکثیر قطعه هدف با اضافه کردن پرایمرها و cDNA و DEPC (حجم کلی ۵۰ میکرولیتر) در سه مرحله پشت سر هم (یک چرخه) صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشت شده، سپس ۳۵ چرخه تکراری ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه) انجام گرفت. در مرحله سوم، بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. همچنین، در هر سیکل PCR یک تیوب کنترل منفی هم گذاشته شد که در آن به جای cDNA، آب دیونیزه استریل ریخته شد.

سپس تجزیه و تحلیل کمی بیان ژن با استفاده Real-time PCR system, (Applied Biosystems, USA) انجام شد. برای انجام Real-time PCR هر واکنش شامل cDNA رقیق شده (۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، هر پرایمر با غلظت ۵ پیکومول بر میکرولیتر، Master Mix و dH₂O بود. سپس، استریپ‌های حاوی نمونه به داخل دستگاه منتقل شده و پس از دادن برنامه دمایی (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، در هر چرخه مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد

¹ Housekeeping gene

² Polymerase Chain Reaction

³ Threshold Cycle



شکل ۱- مروری بر طراحی و روش مطالعه. طراحی شده با [Biorender.com](https://www.biorender.com)

کل مادران در گروه دارای وزن طبیعی ۳۹ نفر، در گروه دارای اضافه وزن ۴۱ نفر و در گروه چاق ۳۸ نفر بود. در این مطالعه میانگین سنی جمعیت بیماران مورد مطالعه $30/40 \pm 5/87$ سال با دامنه ۲۱-۴۳ سال بود. سطح بیان ژن *CYFIP1* در خون بند ناف نوزادان مادران دارای اضافه وزن و چاق نسبت به نوزادان زنان باردار با وزن طبیعی افزایش معنی‌دار نشان داد ($p < 0/001$) (شکل ۳^a).

همانطور که در شکل ۳^b نشان داده شده است، سطوح غلظت کلسترول خون بند ناف نوزادان مادران در رده چاق (شاخص توده بدنی بیشتر یا مساوی ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع) از نظر آماری نسبت به زنان در دسته‌بندی با وزن طبیعی و اضافه وزن، بالاتر بود ($p < 0/001$).

در میان سایر پروفایل‌های لیپیدی، کلسترول در مادران رده دارای اضافه وزن (شکل ۳^b) و TG در مادران رده چاق (شکل ۳^c) غلظت‌های بالاتری در مقایسه با گروه با وزن طبیعی داشتند، ولی سطح HDL بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($p > 0/05$) (شکل ۳^d).

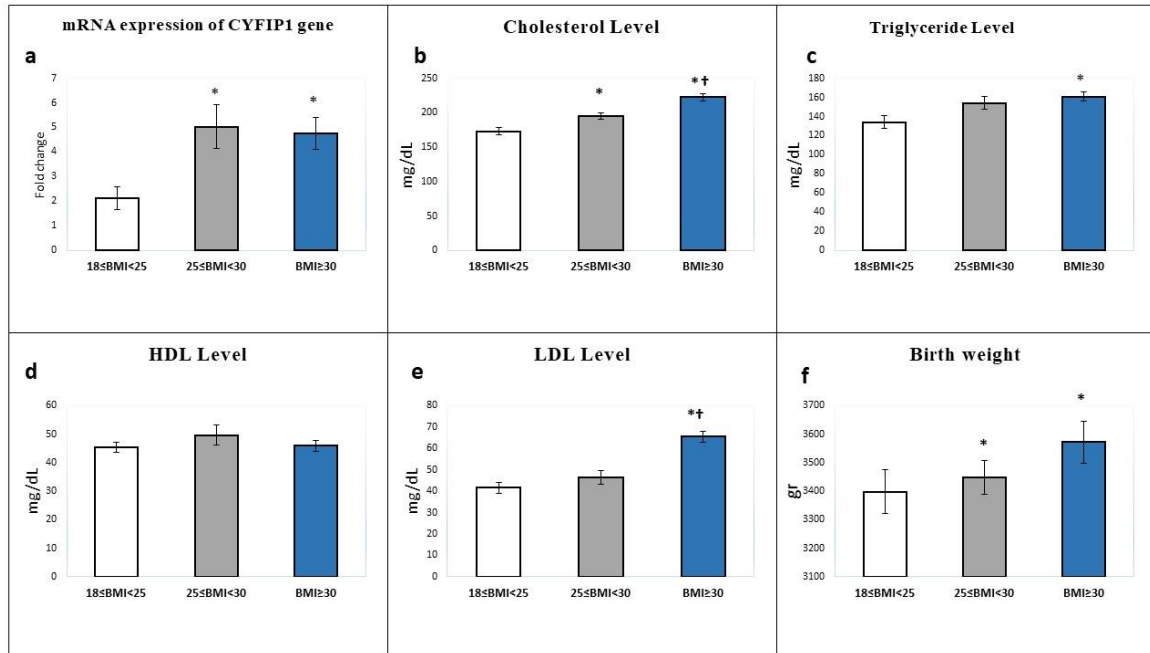
یافته‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت مقایسه چندگروهی از آنوای یک‌طرفه در صورت توزیع نرمال و برای بررسی متغیرهای هر گروه از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. در صورت عدم توزیع نرمال، از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. جهت بررسی ارتباط بین متغیرها از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در مجموع ۱۱۸ زن باردار در این مطالعه وارد شدند. افراد بر اساس BMI به سه گروه: گروه کنترل (شاخص توده بدنی بین ۱۸/۵ تا ۲۵ کیلوگرم بر متر مربع)، گروه دارای اضافه وزن (شاخص توده بدنی بین ۲۵ تا ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع) و گروه چاق (شاخص توده بدنی بیشتر از ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع) تقسیم شدند. تعداد

اضافه وزن بالاتر بود ($p < 0.001$). وزن نوزاد هنگام تولد در هر دو دسته دارای اضافه وزن و چاق به طور قابل توجهی بیشتر از وزن نوزادان مادران با وزن طبیعی بود ($p < 0.001$) (شکل ۲^f).

علاوه بر این بر اساس شکل ۳^e، سطح غلظت LDL خون بند ناف نوزادان مادران در رده چاق (شاخص توده بدنی بیشتر یا مساوی ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع) از نظر آماری نسبت به زنان در دسته بندی با وزن طبیعی و



شکل ۲- بیان ژن *CYFIP1* و پروفایل لیپیدی خون بند ناف (سطح کلسترول، تری گلیسیرید، HDL، LDL) و وزن هنگام تولد نوزادان بر اساس رده بندی شاخص توده بدنی (BMI) مادران قبل از بارداری

تری گلیسیرید ($p = 0.0001$, $r = 0.290$) و سطح LDL ($p = 0.0001$, $r = 0.397$) وجود داشت. جالب توجه است که یک همبستگی مثبت بین بیان *CYFIP1* و کلسترول و LDL نیز مشاهده شد. سایر همبستگی ها در جدول ۱ ارائه شده است.

در این مطالعه، همچنین ارتباط بین BMI مادر قبل از بارداری با بیان ژن *CYFIP1* خون بند ناف، پروفایل لیپیدی، وزن نوزاد هنگام تولد و وضعیت نوزاد برای سن حاملگی بررسی گردید. همبستگی مثبتی بین BMI مادر و بیان ژن *CYFIP1* خون بند ناف ($p = 0.0001$, $r = 0.333$) کلسترول ($p = 0.0001$, $r = 0.520$)

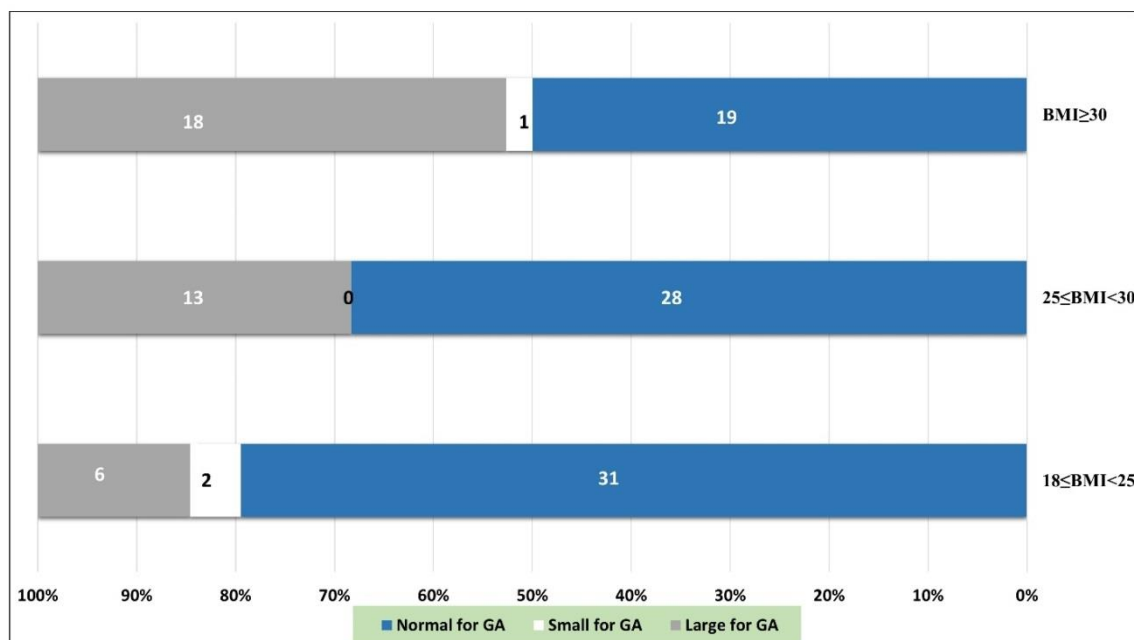
جدول ۱- بررسی همبستگی آماری پیرسون بین BMI، پروفایل لیپیدی، وزن تولد و وضعیت سن بارداری

متغیر	شاخص توده بدنی	ژن <i>CYFIP1</i>	TC	TG	HDL	LDL	وزن هنگام تولد	وضعیت در هنگام تولد
توده شاخص بدنی	-	۰/۳۳۳**	۰/۵۲۰**	۰/۲۹۰**	۰/۰۵۹	۰/۳۹۷**	۰/۱۵۲	۰/۲۶۲**
ژن <i>CYFIP1</i>	-	-	۰/۲۲۳*	۰/۱۹۰*	-۰/۰۱۱	۰/۲۰۴*	۰/۰۸۳	۰/۱۱۰
کلسترول تام	-	-	-	۰/۳۲۷**	-۰/۰۵۰	۰/۶۴۳**	۰/۱۱۷	۰/۱۳۵
تری گلیسیرید	-	-	-	-	-۰/۰۳۷	۰/۳۶۰**	۰/۱۹۴*	۰/۱۸۲*
لیپوپروتئین با چگالی بالا	-	-	-	-	-	-۰/۰۶۲	۰/۱۲۶	۰/۱۱۰
لیپوپروتئین با چگالی کم	-	-	-	-	-	-	۰/۱۰۳	۰/۱۰۱
وزن هنگام تولد	-	-	-	-	-	-	-	۰/۶۹۸**
وضعیت در هنگام تولد	-	-	-	-	-	-	-	-

* همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۵، ** همبستگی معنی دار در سطح ۰/۰۱

سن حاملگی (NGA) در افراد چاق به طور قابل توجهی کاهش نشان داده بود، در حالی که درصد نوزادان مبتلا به LGA در هر دو گروه دارای اضافه وزن و چاق به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$).

همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، درصد نوزادان طبیعی برای سن حاملگی (NGA)^۱، کوچک برای سن حاملگی (SGA)^۲ و بزرگ برای سن حاملگی (LGA)^۳ در زنان با وزن طبیعی به ترتیب ۷۹/۴، ۵/۱ و ۱۵/۳۸ درصد بود. تعداد نوزادان با وضعیت نرمال برای



شکل ۳- تعداد نوزادان (اعداد نشان داده شده در هر ستون) و درصد نوزادان (محور افقی) با وضعیت طبیعی برای سن حاملگی (NGA)، کوچک برای سن حاملگی (SGA) و بزرگ برای سن حاملگی (LGA) طبقه بندی شده بر اساس رده بندی توده شاخص بدنی (BMI) مادران.

تغییر بیان ژن در خون بند ناف و تغییرات پروفایل لپیدی را نشان می دهد. کشف ژن های دخیل در اتیولوژی ASD در سال های اخیر منجر به این باور شده است که ژنتیک و وراثت در ایجاد حساسیت برخی از کودکان به عوامل محیطی تعامل داشته و باعث ایجاد اختلال در مسیر تکامل مغز می شود (۱۸). مطالعات مختلف تفاوت معنی داری را در شاخص رشد ذهنی بین فرزندان مادران چاق و کودکان مادران دارای وزن طبیعی نشان داده است. از طرف دیگر، فرزندان مادران کم وزن نیز در معرض خطر بالاتری برای اختلال در رشد ذهنی هستند. بنابراین، هر دو حد افراطی BMI با افزایش خطر ASD مرتبط است (۱۹، ۲۰).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان mRNA ژن *CYFIP1* در خون بند ناف نوزادان با توجه به رده های مختلف شاخص توده بدنی مادران در قبل از بارداری، متفاوت است؛ به طوری که در خون بند ناف نوزادان مادران دارای اضافه وزن و چاق نسبت به نوزادان زنان باردار با وزن طبیعی افزایش معنی داری نشان داد. مطالعه حاضر همچنین ارتباط بین BMI مادر و عوامل مختلف را بررسی کرد. همبستگی مثبت بین BMI مادر و بیان ژن *CYFIP1* خون بند ناف، کلسترول، تری گلیسیرید، LDL و وضعیت سن بارداری مشخص شد. این همبستگی ها ارتباط بالقوه ای بین چاقی مادر،

¹ Normal for gestational-age

² Small for gestational-age

³ Large for gestational-age

متآنالیز وانگ و همکاران (۲۰۱۶) که تأثیر رده‌های مختلف BMI مادری (کم‌وزنی، اضافه وزن یا چاقی) را در دوران قبل از بارداری یا بارداری بر خطر ایجاد ASD بررسی کرد، نشان داد که کودکان متولد شده از مادران دارای اضافه وزن و چاق به ترتیب ۲۸٪ و ۳۶٪ شانس بیشتری برای ابتلاء به ASD نسبت به کودکان متولد شده از مادران با وزن طبیعی دارند، ولی کمبود وزن مادر با افزایش بروز ASD مرتبط نبود (۹).

چندین فرضیه وجود دارد که بر اساس آنها می‌توان تأثیر BMI مادر را بر ایجاد ASD توضیح داد که مکانیسم‌های ایجاد کننده التهاب، از علل اصلی آن به‌شمار می‌آید. نشان داده شده است که سطوح سرمی پروتئین C (CRP)^۱ در زنان چاق نسبت به زنان باردار با وزن طبیعی، بالاتر است. سطوح بالاتری از سایتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۱ و فاکتور نکروز تومور آلفا در جفت نوزادان زنان چاق نسبت به مادران باردار طبیعی وجود دارد. التهاب در جفت باعث ایجاد پاسخ التهابی سیستمیک در جنین می‌شود که ممکن است منجر به آسیب ماده سفید در مغز جنین شود (۲۱، ۲۲). علاوه بر این، چاقی عامل خطر اصلی برای ایجاد دیابت مادر است که متعاقب آن، هیپرگلیسمی ایجاد شده، بروز ASD در جوامع را نیز افزایش می‌دهد. شیوع بالای ASD در کودکان و ارتباط آن با وضعیت اضافه وزن/چاقی مادران، آن را به یک بار سلامت عمومی در حال حاضر و آینده در جهان تبدیل کرده است (۱۰). فرآیندهای متعددی وجود دارد که از طریق آنها اثر همگرایی چاقی در مادر و دیابت، ممکن است باعث ایجاد ASD در کودکان شود که از جمله می‌توان به ایجاد هیپوکسی در جنین، افزایش تشکیل رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی آسیب دیده اشاره نمود (۲۶-۲۳).

از طرف دیگر، پروتئین CYFIP1 به دلایل مختلف با پاتوزنز ASD مرتبط است: ۱- CYFIP1 سنتز پروتئین و ترجمه پروتئین سیناپسی را با تعامل با پروتئین FMRP^۲ کنترل می‌کند. FMRP به‌عنوان

پروتئین متصل به RNA در سیستم عصبی نقش کلیدی در نوروپلاستیستی^۳ و فرآیند ترجمه سلول عصبی ایفا می‌کند (۲) بیان بیش از حد CYFIP1 باعث ایجاد مورفولوژی عصبی ناهنجار در موجود زنده و همچنین در شرایط آزمایشگاهی از طریق اختلال در تنظیم مسیر سیگنال mTOR می‌شود (۳) در نهایت، ۱۹٪ از ژن‌هایی که با CYFIP1 در ارتباط هستند، در پاتوزنز ASD هم نقش دارند و ۱۰٪ از ژن‌ها با ایجاد اختلالات فکری مرتبط هستند (۲۷، ۲۸).

اگرچه تغییرات بیان ژن در خون بند ناف شواهدی غیرمستقیم از تغییرات در بافت‌های نوزادان است، اما مطالعاتی نیز وجود دارد که از استفاده از خون بند ناف به‌عنوان آینه‌ای از رشد عصبی قبل از تولد حمایت می‌کنند. بررسی ترانسکریپتومی خون بند ناف که توسط ادلو و همکاران (۲۰۱۶) انجام شد، نشان داد که مسیرهای سیگنالینگ التهابی و ایمونولوژیک، هموستاز گلوکز و لیپید و استرس اکسیداتیو، همگی در تأثیرات چاقی مادر بر بیان ژن جنین در هنگام تولد نقش دارند که می‌تواند پیامدهایی برای رشد عصبی و متابولیسم در دوره پس از زایمان داشته باشد (۲۹). همچنین در مطالعه متآنالیز موردانت و همکاران (۲۰۱۹) که روی دو گروه جمعیت با خطر بالای ابتلاء به ASD برای شناسایی تفاوت بیان ژن در خون بند ناف انجام دادند، دخالت مسیرهای ژنی در مکانیسم‌های مربوط به عوامل محیطی، ایمنی و اپی‌ژنتیکی را نشان دادند (۱۷). مطالعه دیگری توسط همین نویسندگان نشان داد که پروفایل متیلاسیون DNA خون بند ناف در نوزادانی که بعداً مبتلا به اختلال طیف اوتیسم می‌شوند، متفاوت بوده که منعکس کننده اختلالات اولیه در ژن‌های مربوط به رشد و تکامل سیستم عصبی است. آنها گزارش کردند که در بدو تولد، قبل از تشخیص ASD، متیلاسیون DNA متمایز در خون بند ناف بر روی نواحی تنظیمی و ژن‌های مربوط به رشد عصبی اولیه جنین بینش جدیدی را برای تشخیص و درمان زودهنگام ارائه می‌دهد (۳۰). در مطالعه حاضر نیز همبستگی مثبتی بین BMI مادر و بیان ژن CYFIP1 خون بند ناف وجود داشت.

¹ C-reactive protein

² Fragile-X mental retardation protein

³ neuroplasticity

لیپیدها در پاتوژنز ASD نقش مهمی را بازی می‌کنند (۲۵). ممکن است برخی تفاوت‌ها در نتایج مطالعات فوق ناشی از تأثیر توزیع جنسیتی متفاوت (پسر یا دختر) کودکان مورد بررسی، بر پارامترهای مورد مطالعه باشد؛ به همین منظور در مطالعه حاضر فقط از نمونه‌های نوزادان پسر استفاده گردید تا همگنی در جنسیت وجود داشته باشد.

وزن و قد نوزاد در هنگام زایمان هر دو نشان‌دهنده رشد داخل رحمی به‌عنوان نتیجه عوامل مادری، جفتی و جنینی هستند و به‌طور کلاسیک برای شناسایی نوزادان در معرض خطر استفاده می‌شود. هم نوزادان کوچک و هم بزرگ برای سن حاملگی، با عوارض پری‌ناتال بیشتر و همچنین خطرات آینده برای فرزندان همراه هستند (۳۴). در مطالعه حاضر بین درصد نوزادان طبیعی برای سن حاملگی، کوچک برای سن حاملگی و بزرگ برای سن حاملگی و *BMI*، *TG* و وزن هنگام تولد رابطه مثبتی وجود داشت، اما چنین همبستگی با بیان ژن *CYFIP1* وجود نداشت. در گروه‌های دارای اضافه وزن و چاق، نسبت نوزادان *LGA* بسیار بیشتر بود. در گروه چاق، تعداد نوزادان *NGA* کمتر از زنان با وزن طبیعی بود. در مطالعه حاضر، سایر عوامل مخدوش‌کننده مربوط به محدودیت رشد با واسطه جفتی یا غیرجفتی برای *SGA* یا *LGA* حذف شده بودند؛ به‌عنوان مثال، ناهنجاری کروموزومی، عفونت جنین، کم‌خونی شدید یا شرایط پزشکی مانند دیابت، پره‌اکلامپسی و فشار خون بالا حذف شده بودند. محدودیت این مطالعه، عدم پیگیری نوزادان جهت بررسی امکان ابتلای آنها به *ASD* و آنالیز ارتباط ابتلاء با متغیرهای مورد مطالعه بود. از طرفی با توجه به اینکه در این مطالعه نتیجه بررسی بیانی سلول‌های خون بند ناف به سلول‌های خود نوزاد تعمیم داده شده بود، بنابراین برای گرفتن نتیجه تکمیلی و بررسی صحت و میزان مشابهت الگوی بیانی یافت شده در آزمایش، بررسی‌های بیشتر خصوصاً در نمونه خون خود نوزادان مورد نیاز است.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که افزایش بیان ژن *CYFIP1* در *UCB* با رده‌های مختلف شاخص توده

تجزیه و تحلیل پروفایل لیپیدی نیز نشان داد که تفاوت‌های قابل توجهی در غلظت لیپیدی خون بند ناف نوزادان بین رده‌های مختلف *BMI* مادران وجود دارد. نوزادان مادران گروه چاق (شاخص توده بدنی بیشتر یا مساوی ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع) افزایش غلظت کلسترول و *LDL* خون بند ناف را نسبت به نوزادان مادران با شاخص توده بدنی نرمال و همچنین دارای اضافه وزن نشان دادند. در مقایسه با گروه با شاخص توده بدنی طبیعی، کلسترول در مادران دارای اضافه وزن و *TG* در مادران چاق افزایش نشان داد. این تغییرات همبستگی مثبتی را بین *BMI* مادر و کلسترول، *TG*، *LDL* خون بند ناف نشان داد. اگرچه، مقایسه نتایج مطالعه حاضر با داده‌های سایر مطالعات متفاوت بود؛ به‌عنوان مثال در مطالعه موکارزل و همکاران (۲۰۲۰) سطح لیپیدی خون بند ناف فرزندان متولد شده از زنان چاق، کمتر از سطوح لیپیدی آنهایی بود که از مادران با وزن طبیعی متولد شده بودند (۳۱) که با نتیجه مطالعه حاضر متفاوت بود. همچنین مطالعه گرافتی و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که *BMI* مادر با سطح لیپید خون مرتبط است، زیرا *BMI* بالاتر با غلظت بالاتر کلسترول تام در اوایل بارداری و *TGs* در اوایل و اواخر بارداری مرتبط است (۳۲). از سوی دیگر تجزیه و تحلیل لیپوپروتئین سرم انجام شده توسط یوسوی و همکاران (۲۰۲۰) در مقیاس بزرگ نشان داد که پروفایل لیپوپروتئینی (لیپوپروتئین‌ها، *LDL*، *HDL*، *VLDL*، *Chl* و *TG*)، می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای ارزیابی بالینی و پاتوژنز یا تشخیص *ASD* استفاده شود. این مطالعه با بررسی لیپیدومیکس^۱ به ۴۸ متابولیت که بیشتر مولکول‌های مرتبط با لیپید بودند، دست یافت که آنها را به‌عنوان اهداف جدید برای تولید و متابولیسم لیپید، استرس اکسیداتیو و عملکرد سیناپسی در *ASD* معرفی نمود (۳۳). لیپیدها در عملکردهای مختلف عصبی از جمله ریخت‌زایی، مهاجرت، تمایز و شکل‌پذیری سیناپسی نقش حیاتی دارند که همگی در رشد و تکامل مغز مهم هستند. همه این عملکردها و همچنین متابولیسم

¹ Lipidomics

تشکر و قدردانی

این مقاله توسط مرکز تحقیقات بیماری‌های متابولیک زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان پشتیبانی شده است (کد تأیید اخلاق: IR.ZUMS.REC.1398.360). بدین‌وسیله از تمام افرادی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ تضاد منافع مرتبط با این مقاله نداشتند.

بدنی مادری قبل از بارداری و پروفایل لیپیدی خون بند ناف همبستگی مثبت دارد، که نشان می‌دهد عوامل خطری که در افزایش BMI نقش دارند، با توجه به نقش ژن *CYFIP1* در تکامل مغز، ممکن است بتواند پیامدهای منفی بر سلامت و رشد جنین ایجاد کنند. از طریق بررسی ژن‌های مربوط به رشد عصبی اولیه جنین در خون بند ناف، در بدو تولد و قبل از تشخیص ASD، می‌توان بینش جدیدی را برای تشخیص و درمان زودهنگام به‌دست آورد.

منابع

1. Maenner MJ. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2016. *MMWR. Surveillance Summaries* 2020; 69.
2. Loomes R, Hull L, Mandy WP. What is the male-to-female ratio in autism spectrum disorder? A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 2017; 56(6):466-74.
3. Baghdadli A, Picot MC, Pascal C, Pry R, Aussilloux C. Relationship between age of recognition of first disturbances and severity in young children with autism. *European child & adolescent psychiatry* 2003; 12:122-7.
4. Lyall K, Schmidt RJ, Hertz-Picciotto I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *International journal of epidemiology* 2014; 43(2):443-64.
5. Emberti Gialloreti L, Mazzone L, Benvenuto A, Fasano A, Garcia Alcon A, Kraneveld A, et al. Risk and protective environmental factors associated with autism spectrum disorder: evidence-based principles and recommendations. *Journal of clinical medicine* 2019; 8(2):217.
6. Zahedi AF, Akouchekian M. The Effects of Environmental Factors and Immune Deficiency in the Etiology of Autistic Behavior. *Razi Journal of Medical Sciences* 2017; 23(153):26-34.
7. Jiang CC, Lin LS, Long S, Ke XY, Fukunaga K, Lu YM, et al. Signalling pathways in autism spectrum disorder: mechanisms and therapeutic implications. *Signal transduction and targeted therapy* 2022; 7(1):229.
8. Mandy W, Lai MC. Annual Research Review: The role of the environment in the developmental psychopathology of autism spectrum condition. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 2016; 57(3):271-92.
9. Wang Y, Tang S, Xu S, Weng S, Liu Z. Maternal body mass index and risk of autism spectrum disorders in offspring: a meta-analysis. *Scientific reports* 2016; 6(1):34248.
10. Getz KD, Anderka MT, Werler MM, Jick SS. Maternal Pre-pregnancy Body Mass Index and Autism Spectrum Disorder among Offspring: A Population-Based Case-Control Study. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2016; 30(5):479-87.
11. Andersen CH, Thomsen PH, Nohr EA, Lemcke S. Maternal body mass index before pregnancy as a risk factor for ADHD and autism in children. *European child & adolescent psychiatry* 2018; 27:139-48.
12. Lyall K, Croen L, Daniels J, Fallin MD, Ladd-Acosta C, Lee BK, et al. The changing epidemiology of autism spectrum disorders. *Annual review of public health* 2017; 38:81-102.
13. Oguro-Ando A, Rosensweig C, Herman E, Nishimura Y, Werling D, Bill BR, et al. Increased *CYFIP1* dosage alters cellular and dendritic morphology and dysregulates mTOR. *Molecular psychiatry* 2015; 20(9):1069-78.
14. Wang J, Tao Y, Song F, Sun Y, Ott J, Saffen D. Common regulatory variants of *CYFIP1* contribute to susceptibility for autism spectrum disorder (ASD) and classical autism. *Annals of human genetics* 2015; 79(5):329-40.
15. Kadakia R, Scholtens DM, Rouleau GW, Talbot O, Ilkayeva OR, George T, et al. Cord blood metabolites associated with newborn adiposity and hyperinsulinemia. *The Journal of pediatrics* 2018; 203:144-9.
16. Cao T, Zhao J, Hong X, Wang G, Hu FB, Wang X, et al. Cord blood metabolome and BMI trajectory from birth to adolescence: a prospective birth cohort study on early life biomarkers of persistent obesity. *Metabolites* 2021; 11(11):739.
17. Mordaunt CE, Park BY, Bakulski KM, Feinberg JI, Croen LA, Ladd-Acosta C, et al. A meta-analysis of two high-risk prospective cohort studies reveals autism-specific transcriptional changes to chromatin, autoimmune, and environmental response genes in umbilical cord blood. *Molecular autism* 2019; 10:1-21.
18. Sealey LA, Hughes BW, Sriskanda AN, Guest JR, Gibson AD, Johnson-Williams L, et al. Environmental factors in the development of autism spectrum disorders. *Environment international* 2016; 88:288-98.

19. Hinkle SN, Schieve LA, Stein AD, Swan DW, Ramakrishnan U, Sharma AJ. Associations between maternal prepregnancy body mass index and child neurodevelopment at 2 years of age. *International journal of obesity* 2012; 36(10):1312-9.
20. Surén P, Gunnes N, Roth C, Bresnahan M, Hornig M, Hirtz D, et al. Parental obesity and risk of autism spectrum disorder. *Pediatrics* 2014; 133(5):e1128-38.
21. van der Burg JW, Sen S, Chomitz VR, Seidell JC, Leviton A, Dammann O. The role of systemic inflammation linking maternal BMI to neurodevelopment in children. *Pediatric research* 2016; 79(1):3-12.
22. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* 2008; 29(3):274-81.
23. Chen X, Scholl TO. Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus. *Current diabetes reports* 2005; 5(4):282-8.
24. Rowland J, Wilson CA. The association between gestational diabetes and ASD and ADHD: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports* 2021; 11(1):5136.
25. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicological sciences* 2009; 108(1):4-18.
26. Kong L, Norstedt G, Schalling M, Gissler M, Lavebratt C. The risk of offspring psychiatric disorders in the setting of maternal obesity and diabetes. *Pediatrics* 2018; 142(3).
27. Fricano-Kugler C, Gordon A, Shin G, Gao K, Nguyen J, Berg J, et al. CYFIP1 overexpression increases fear response in mice but does not affect social or repetitive behavioral phenotypes. *Molecular autism* 2019; 10:1-16.
28. Pagani M, Barsotti N, Bertero A, Trakoshis S, Ulysse L, Locarno A, et al. mTOR-related synaptic pathology causes autism spectrum disorder-associated functional hyperconnectivity. *Nature communications* 2021; 12(1):6084.
29. Edlow AG, Hui L, Wick HC, Fried I, Bianchi DW. Assessing the fetal effects of maternal obesity via transcriptomic analysis of cord blood: a prospective case-control study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2016; 123(2):180-9.
30. Mordaunt CE, Jianu JM, Laufer BI, Zhu Y, Hwang H, Dunaway KW, et al. Cord blood DNA methylome in newborns later diagnosed with autism spectrum disorder reflects early dysregulation of neurodevelopmental and X-linked genes. *Genome medicine* 2020; 12:1-25.
31. Mocarzel CC, Velarde GC, Antunes RD, Moreira de Sá RA, Kurjak A. Maternal obesity influences the endocrine cord blood profile of their offspring. *Journal of perinatal medicine* 2020; 48(3):242-8.
32. Geraghty AA, Alberdi G, O'Sullivan EJ, O'Brien EC, Crosbie B, Twomey PJ, et al. Maternal and fetal blood lipid concentrations during pregnancy differ by maternal body mass index: findings from the ROLO study. *BMC pregnancy and childbirth* 2017; 17:1-7.
33. Usui N, Iwata K, Miyachi T, Takagai S, Wakusawa K, Nara T, et al. VLDL-specific increases of fatty acids in autism spectrum disorder correlate with social interaction. *EBioMedicine* 2020; 58.
34. Beaumont RN, Kotecha SJ, Wood AR, Knight BA, Sebert S, McCarthy MI, et al. Common maternal and fetal genetic variants show expected polygenic effects on risk of small-or large-for-gestational-age (SGA or LGA), except in the smallest 3% of babies. *PLoS genetics* 2020; 16(12):e1009191.

***CYFIP1* gene expression in umbilical cord blood and its relationship with maternal body mass index**

Mahsa Eskandari^{1,2}, Elham Hosseini^{3,4*}, Zahra Zandieh⁵, Ehsan Noori⁶, Raheleh Kafaeinezhad⁷, Mansour Sadeghzadeh⁸, Ali Awsat Mellati⁹

1. PhD Student, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran.
2. School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran.
4. Zanzan Metabolic Diseases Research Center, Zanzan, Iran.
5. Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
6. M.Sc. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran.
7. B.Sc. of Biology, School of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
8. Professor, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran.
9. Professor, Department of Biochemistry, Zanzan Metabolic Diseases Research Center, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran.

Received: Dec 25, 2023 **Accepted:** Mar 25, 2024

Abstract

Introduction: The present study was conducted with aim to investigate the expression of the *CYFIP1* gene in the umbilical cord blood (UCB) of newborns and its possible relationship with different categories of pre-pregnancy maternal body mass index (BMI), lipid profile, birth weight and infant status for gestational age.

Methods: This cross-sectional study was conducted from 2020 to 2021 on UCB of 118 male newborns from Mousavi and Bahman hospitals in Zanzan. According to pre-pregnancy BMI, women were divided into three groups: normal, overweight and obese. Each UCB sample was divided into two parts. A part was used to analyze the lipid profile including low-density lipoprotein (LDL), triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and high-density lipoprotein (HDL). mRNA extraction of peripheral blood mononuclear cells was performed to investigate the expression of *CYFIP1* gene. Data were analyzed using SPSS statistical software (version 21) and Pearson's correlation test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The expression of the *CYFIP1* gene was elevated in UCB from women classified as overweight or obese compared to those with normal weight ($p=0.001$). UCB of obese women exhibited higher cholesterol and LDL levels compared to normal-weight and overweight women ($p=0.001$). Positive correlations were observed between pre-pregnancy maternal BMI and cord blood *CYFIP1* gene expression ($r=0.333$, $p=0.0001$), as well as cholesterol ($r=0.520$, $p=0.0001$), TG ($r=0.290$, $p=0.001$), LDL ($r=0.397$, $p=0.0001$), and birth weight of infants categorized based on gender and gestational age ($r=0.262$, $p=0.001$).

Conclusion: Increased expression of *CYFIP1* gene is correlated positively with

► **Please cite this article as:**

Eskandari M, Hosseini E, Zandieh Z, Noori E, Kafaeinezhad R, Sadeghzadeh M, Awsat Mellati A. *CYFIP1* gene expression in umbilical cord blood and its relationship with maternal body mass index. **Iran J Obstet Gynecol Infertil** 2024; 27(1):31-45. DOI: 10.22038/IJOGI.2024.75355.5877

different categories of pre-pregnancy BMI and lipid profile, implying that regarding the role of *CYFIP1* gene in brain development, the risk factors contributing to increasing BMI may have negative consequences on fetal health and development.

Keywords: Autism spectrum disorder, Body mass index, Cytoplasmic FMR1 interacting protein 1, *CYFIP1*