بررسی همراهی پلی‌مورفیسم rs4648551 ژن P73 در زنان ایرانی مبتلا به سقط مکرر با دلایل ناشناخته

سمیه طبسی[۱]، دکتر سید مصطفی حسینی[۲*]

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲. استادیار گروه ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی، پژوهشکده فناوری ژن و سلول، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۰۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

خلاصه

مقدمه: سقط‌های مکرر خودبه‌خودی به‌عنوان یک رویداد تکرارپذیر از دو یا بیشتر سقط قبل از هفته ۲۰ تعریف می‌شود. در سقط مکرر به‌عنوان یک بیماری چندعاملی، مسائل متعددی دخیل است و نقص ژنتیکی به‌عنوان یکی از عوامل عمده خطر برای سقط مکرر مطرح می‌باشد. با توجه به نقش مؤثر ژن p73 در فرآیند تقسیم بلاستوسیست اولیه و حفاظت از سلول‌های جنسی، به‌نظر می‌رسد پلی‌مورفیسم rs4648551 در این ژن p73، با بروز علائم سقط مکرر خودبه‌خودی ارتباط دارد. مطالعه حاضر با هدف مقایسه فراوانی این پلی‌مورفیسم بین دو گروه زنان ایرانی مبتلا به سقط مکرر با دلایل ناشناخته و زنان سالم اجرا شد.

روش‌کار: این مطالعه تحلیلی از نوع مورد - شاهدی در سال ۹۵-۱۳۹۴ بر روی ۹۰ بیمار که همگی دارای سابقه ۲ سقط مکرر خودبه‌خودی متوالی بدون علت مشخص در مقایسه با ۱۱۰ نفر از افراد سالم که دارای حداقل ۲ بارداری موفق بودند، به‌عنوان کنترل انجام شد. DNA با روش RGDE استخراج و ژنوتایپینگ با روش Tetra ARMS اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون کای دو انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در پلی‌مورفیسم (rs4648551 A<G)، فراوانی ژنوتیپ‌های GG، AG و AA در ژن p73 در زنان گروه کنترل ۱۱/۸۱٪، ۶۹/۰۹٪ و ۱۹/۰۹٪ و در زنان گروه سقط ۳۱/۱۱٪، ۴۶/۶۷٪ و ۲۲/۲۲٪ بود که تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنادار بود (p<۰/۰۵)، اما مقدار تفاوت آللی بین گروه بیمار و کنترل ۰/۰۶۶ به‌دست آمد که معنی‌دار نبود و مطابق نتایج به‌دست آمده، مدل توارث غالبی پیشنهاد شد (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: بین پلی‌مورفیسم rs4648551 و سقط مکرر ایدیوپاتیک ارتباط معنی‌داری وجود دارد.

کلمات کلیدی: پلی‌مورفیسم، چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، ژن p73، سقط‌های مکرر خودبه‌خودی

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر سید مصطفی حسینی؛ پژوهشکده فناوری ژن و سلول، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران. **تلفن**: ۸۶۰۳۵۴۵۰-۰۲۱؛ **پست الکترونیک**: smhosseini@bmsu.ac.ir

مقدمه

سقط جنین، به‌عنوان شایع‌ترین عارضه در سه ماهه اول و دوم دوران بارداری شناخته می‌شود. بر اساس تعریف، سقط‌های مکرر خودبه‌خودی به از دست دادن متوالی حداقل دو یا تعداد بیشتر بارداری قبل از هفته بیستم و یا به سقط جنینی با وزنی کمتر از ۵۰۰ گرم اطلاق می‌شود (۱، ۲). حدود ۵٪ از زوجین با مشکل سقط جنین مواجه می‌شوند، اما به‌نظر می‌رسد آمار حقیقی بیشتر باشد، زیرا بسیاری از موارد سقط جنین، خیلی زودتر از زمانی که فرد از بارداری خود آگاهی می‌یابد، اتفاق می‌افتند (۳).

سقط مکرر به دو گروه اولیه و ثانویه تقسیم می‌گردد. در سقط مکرر اولیه، فرزند زنده‌ای متولد نمی‌شود، اما در سقط مکرر ثانویه، پس از یک بارداری موفق، سقط‌های متوالی آغاز می‌شوند (۲، ۳). سقط مکرر یک بیماری چندعاملی[1] است که علاوه بر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی و پاتولوژیکی نیز در بروز آن نقش دارند. مهم‌ترین دلایل شناخته شده دخیل در بروز سقط‌های مکرر خودبه‌خودی (RPL)[2] شامل ناهنجاری‌های کروموزومی، نقایص آناتومیکی رحم، اختلالات انعقادی خون، عوامل ایمونولوژیکی، اختلالات هورمونی، عفونت‌های میکروبی، فاکتورهای محیطی، عوامل روحی روانی و سبک زندگی می‌باشند (۱)، اما با این حال تقریباً در ۵۰٪ از موارد، RPL همچنان ناشناخته باقی مانده است (۶-۴). تاکنون، تحقیقات گسترده‌ای برای کشف مکانیسم‌های مولکولی دقیق درگیر در پاتوفیزیولوژی RPL انجام شده است (۱۱-۷).

در بین عوامل مؤثر در بروز RPL، ژن‌هایی که در مسیرهای رشد و نمو جنین نقش دارند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. مطالعات زیادی نشان می‌دهد که تغییرات پلی‌مورفیسم تک نوکلوتیدی (SNP)[3] در ژن‌های درگیر در مسیرهای مرتبط با نمو جنینی با RPL همراهی معنی‌داری نشان می‌دهد (۱۲). SNP تنوع توالی‌های DNA در یک نوکلئوتید در بین اعضای یک گونه می‌باشد؛ به‌طوری‌که فراوانی آن حداقل در ۱٪ از افراد جمعیت مشاهده شود. پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی در حدود هر ۳۰۰-۱۰۰ باز در طول ۳ میلیارد باز در ژنوم انسان اتفاق می‌افتد (۱۳، ۱۴). بیش از ۹۰٪ از تغییرات نوکلئوتیدی در سطح DNA را تغییرات تک نوکلئوتیدی به خود اختصاص می‌دهند (۱۳).

یکی از مهم‌ترین ژن‌های مؤثر در موفقیت‌آمیز بودن یک بارداری موفق، مسیر پیام‌رسانی مرتبط با خانواده ژنی p53 می‌باشد. این خانواده ژنی از سه فاکتور رونویسی (TF) کلیدی شامل p53، p63 و p73 تشکیل شده است. پروتئین‌های خانواده p53 خود محصول به‌کارگیری متفاوت پروموترها و نیز پیرایش متناوب[4] از مولکول رونوشت‌برداری شده پیام‌رسان[5] است (۱۹-۱۵).

پروتئین p73 یکی از اعضای مهم خانواده p53 می‌باشد که دارای دو ایزوفورم TAp73 و ΔNp73 است (۲۰). با توجه به اینکه کاهش کیفیت تخمک در مادر منجر به رشد غیرطبیعی جنین می‌شود، پیشنهاد شده است که p73 از طریق ایزوفورم TAp73 جهت تولیدمثل مادری ضروری می‌باشد. اهمیت ایزوفورم TAp73 در اتصالات فیزیکی به پروتئین‌های کینه توکوری شامل BUB1، BUB3 وBUBR1 بوده که در ورود مناسب به مرحله آنافاز تقسیم سلولی اهمیت کلیدی دارد. بنابراین فقدان عملکرد TAp73 در رشد تخمک منجر به شکست در مرحله پیش از لانه‌گزینی در نمو جنین می‌شود (۱۲). TAp73 به واسطه نقاط بازرسی مونتاژ دوک (SAC)[6] نقش خود را ایفا می‌کند؛ به‌طوری‌که در صورت فقدان عملکرد صحیح سبب کاهش کیفیت بلاستوسیست، نقص در مجموعه کینه توکوری و در نهایت عدم پایداری میکروتوبول می‌گردد (۱۲). فقدان TAp73 منجر به افزایش ناپایداری ژنومی[7] و آنیوپلوئیدی در رده سلول جنسی[8] می‌شود. در مطالعه لوین و همکاران (۲۰۱۱) که در

[1] Multifactorial
[2] Recurrent pregnancy loss
[3] single-nucleotide polymorphism
[4] Alternative splicing
[5] mRNA
[6] Spindle assembly checkpoint
[7] chromosome Instability
[8] germ line

موش انجام شد، نشان داد که تخمک فاقد TAp73 منجر به افزایش قابل توجه آنیوپلوئیدی، افزایش دوک غیرنرمال و کاهش شایستگی تکاملی در مرحله پیش از لانه‌گزینی می‌گردد (۱۱، ۲۰). به‌علاوه، اکثر تخمک‌های واجد حذف این ایزوفورم، جنین‌هایی با بلاستومر چند هسته‌ای و بلاستوسیت کم‌کیفیت را به‌وجود می‌آورند. یکی دیگر از عملکردهای TAp73 تنظیم نرخ تخمک‌گذاری است (۲۱). موش ماده‌ای که حامل نقص در TAp73 خود می‌باشد، دیده شده است که پیشرفت طبیعی تخمک را به سمت لوله‌های فالوپ نشان نمی‌دهد. این شواهد نشان می‌دهد که TAP73 علاوه بر اینکه روی مخزن فولیکولی اثر مؤثر دارد، نرخ تخمک‌گذاری را نیز تنظیم می‌کند (۱۲).

با توجه به همولوژی زیاد در ساختار و عملکرد اعضای خانواده p53، فرضیه مطالعه حاضر بر پایه نقش کلیدی پلی‌مورفیسم مرتبط بر روی ژن p73، به واسطه عملکرد پیش آپوپتوزی و کنترل چرخه سلولی این ژن، استوار بود. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای بر روی ارتباط بین RPL ناشناخته و ژنوتیپ rs4648551 در ژن p73 در جمعیت زنان ایرانی انجام نشده است، مطالعه حاضر با هدف بررسی تغییرات پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (rs4648551) بر روی ژن p73 و نیز بررسی ارتباط آن با خطر بروز ریسک RPL ناشناخته در زنان ایرانی انجام شد.

روش‌کار

در این مطالعه تحلیلی از نوع موردی- شاهد نمونه‌ها از افرادی که در سال‌های ۹۵-۱۳۹۴ به بیمارستان‌های الزهراء (س)، آیت‌الله طالقانی و جهاد دانشگاهی تبریز مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری گردید.

زنان ایرانی با میانگین سنی ۵/۴±۲۸/۲، دامنه سنی ۴۱-۲۱ سال با سابقه دو سقط مکرر خودبه‌خودی بدون علت مشخص و بدون سابقه بارداری موفق به‌عنوان گروه بیمار (معیار ورود به مطالعه) وارد مطالعه شدند و در انتها ۹۰ نمونه به‌عنوان مورد وارد مطالعه شدند. ۱۱۰ زن ایرانی به عنوان گروه شاهد (با میانگین سنی ۴/۳±۲۷/۲، دامنه سنی ۳۸-۲۱ سال) بدون سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو باروری موفق در نظر گرفته شدند.

طی پرسشنامه‌ای که به زنان هنگام نمونه‌گیری داده شد، زنانی که سقط آنها خودبه‌خودی نبوده و نیز زنانی که علت سقط مکرر خودبه‌خودی آنها ناهنجاری‌های کروموزومی در جنین، مشکلات آناتومیک در رحم و یا عفونت‌های مرتبط با سقط بود (توکسوپلاسموز)، از مطالعه خارج شدند (معیار خروج از مطالعه).

به‌منظور خون‌گیری و انجام فاز اجرایی طرح، تمام زنان مورد مطالعه رضایت‌نامه تدوین شده را آگاهانه امضاء نمودند. این مطالعه پس از کسب موافقت کمیته اخلاق (IR.BMSU.RBC.1395.769) دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله الاعظم (عج) در سال ۹۵-۱۳۹۴ در استان‌های تهران و تبریز اجرا شد.

استخراج DNA، طراحی پرایمر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

میزان ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری و در ادامه تخلیص DNA از سلول‌های خونی به روش RGDE[1] اجرا گردید (۲۲). بررسی کمّی و کیفی DNA استخراج شده با نانودراپ (Thermofisher, USA) و الکتروفورز (BioRad, USA) بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ انجام گرفت. DNAهای استخراج شده جهت آنالیزهای مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

طراحی آغازگر جهت ژنوتایپینگ rs4648551 در ژن TP73 بر پایه روش TETRA ARMS با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo 7، GENE Runner و Blast اجرا شد (۲۳) (جدول ۱).

[1] Rapid Genomic DNA Extraction

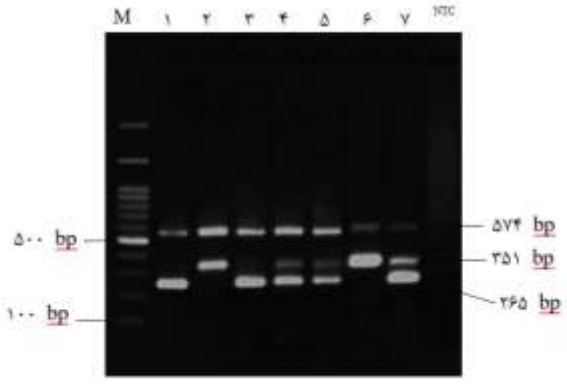
جدول۱- مشخصات آغازگرهای طراحی شده در مطالعه حاضر

پلی‌مورفیسم	آلل	آغازگر (توالی ′۳ ⟵ ′۵)	اندازه محصول (bp)
rs4648551[1] (A<G)	A	فورواد A: TCCGTCAGGGCTGAGGATCA	(۳۵۱/۵۷۴)*
		ریورس A: TGTGGCAATCGCCCCTGTTTC	
	G	فورووارد G: GCAGGCTCCAGCTCCTGTGG	(۵۷۴/۲۶۵)**
		ریورس G: AACATCCTCTGCAGATGCCACGC	

*آلل موتانت، **آلل طبیعی، [1]Reference SNP

جهت تعیین ژنوتایپ نمونه‌های زنان RPL و شاهد، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. شرایط بهینه واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس با غلظت نهایی ۱/۵ مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (شرکت Ampliqon، دانمارک) و برای آلل A آغازگر پیشرو ۱/۲ میکرولیتر، آغازگر پیرو ۰/۷ میکرولیتر و برای آلل G آغازگر پیشرو ۰/۵ میکرولیتر و آغازگر پیرو ۰/۹ میکرولیتر و میزان الگوی ورودی به واکنش ۴۵ نانوگرم بود. برنامه حرارتی ترموسایکلر (BIO RAD) به‌منظور تکثیر به‌ترتیب دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل: واسرشتگی ۹۵ درجه به‌مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در دمای ۶۴ درجه به‌مدت ۲۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه و سپس یک چرخه مرحله گسترش به‌مدت ۵ دقیقه اجرا شد. پس از PCR، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ که با رنگ ویژه رنگ‌آمیزی DNA (Gel stain) رنگ‌آمیزی شد و جهت مشاهده باند، محصولات PCR زیر پرتو UV برده و به کمک خط‌کش مولکولی، صحت انجام کار تأیید گردید.

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون کای اسکوائر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.



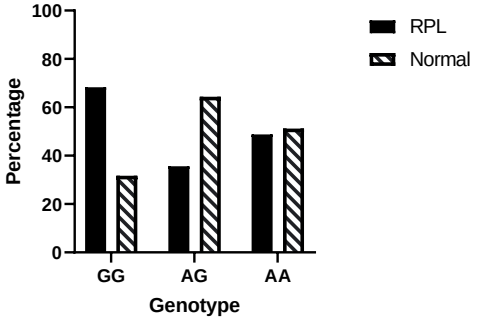
شکل ۱- نتایج حاصل از PCR پلی‌مورفیسم rs4648551 بر اساس روش Tetra- ARMS. خط‌کش مولکولی ۱۰۰bp، نمونه ۱ و ۳ هموزیگوت (GG)، نمونه ۲ و ۶ هموزیگوت (AA)، نمونه ۵، ۴ و ۷ هتروزیگوت (AG) و NTC کنترل منفی را نشان می‌دهد.

یافته‌ها

مطالعه حاضر بر روی ۹۰ بیمار و ۱۱۰ نفر از افراد سالم انجام شد. برای پلی‌مورفیسم rs4648551 A<G مقدار فراوانی افرادی که ژنوتیپ هموزیگوت A/A، هموزیگوت G/G و هتروزیگوت A/G داشتند در هر دو گروه طبق جدول ۲ مشاهده و نمودار آن رسم گردید (شکل ۲) که تفاوت بین گروه بیمار و کنترل معنی‌دار به‌دست آمد (p=۰/۰۰۱) که نشان‌دهنده ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مورفیسم مورد بررسی با علائم سقط مکرر بود (p<۰/۰۵).

جدول ۲- فراوانی ژنوتیپ‌ها برای پلی‌مورفیسم rs4648551 در ژن p73

ژنوتایپ	گروه مورد	گروه شاهد	سطح معنی‌داری
GG	۲۸ (۳۱ /۱)	۱۳ (۱۱/۸)	۰/۰۰۱
AG	۴۲ (۴۶/۷)	۷۶ (۶۹/۱)	
AA	۲۰ (۲۲/۲)	۲۱ (۱۹/۱)	
مجموع	۹۰ (۱۰۰)	۱۱۰ (۱۰۰)	



شکل ۲- نمودار میله‌ای مقایسه بین ژنوتیپ‌های نمونه‌های واجد علائم RPL ناشناخته در مقایسه با گروه کنترل. همان‌طورکه در تصویر مشاهده می‌شود درصد ژنوتیپی هتروزیگوت (AG) در گروه نرمال در مقایسه با گروه RPL بیشتر است. (محور عمودی: درصد فراوانی افراد، محور افقی: گروه‌های ژنوتیپی در گروه نرمال و RPL)

فراوانی آللی برای آلل‌های A و G این پلی‌مورفیسم در دو گروه بیمار و کنترل محاسبه گردید که مقدار آن در گروه بیمار و کنترل طبق جدول ۳ به‌دست آمد.

جدول ۳- فراوانی آلل ها برای پلی‌مورفیسم rs4648551 در ژن p73

آلل	گروه		سطح معنی‌داری	سطح اطمینان ۹۵٪	
	مورد	شاهد		بالا	پایین
A	۸۲ (۴۵/۶)	۱۱۸ (۵۳/۶)			
G	۹۸ (۵۴/۴)	۱۰۲ (۴۶/۴)	۰/۰۶۶	۲/۰۵۳	۰/۹۳۱
مجموع	۱۸۰ (۱۰۰)	۲۲۰ (۱۰۰)			

مقدار تفاوت آللی بین گروه بیمار و کنترل ۰/۰۶۶ به‌دست آمد که از نظر آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵) (جدول ۳).

ارزیابی پیش‌بینی میزان ریسک (OR) در سطح اطمینان ۹۵٪، برای آلل G نسبت به آلل A نشان داد که با تغییر آلل G به A، میزان ریسک بروز فنوتیپ RPL به میزان ۱/۳۸۳ برابر با ریسک بیشتری همراه خواهد بود، اما با توجه به محاسبه میزان P-value این ریسک افزایشی معنی‌دار محاسبه نگردید (p>۰/۰۵).

به‌منظور ارزیابی نحوه وراثت ژنوتیپی واریانت مورد بررسی و محاسبه ریسک خطر بروز RPL، نسبت به آنالیز سه مدل غالب، مغلوب و هم بارزی اقدام گردید. نتایج نشان داد که مدل وراثتی غالب به‌طور معنی‌داری بر اساس فراوانی ژنوتیپی وارایانت همبستگی معنی‌داری دارد (جدول ۴).

جدول ۴- محاسبه نوه توارت پلی‌مورفیسم rs4648551 در ژن p73

ژنوتیپ	گروه		سطح معنی‌داری
	شاهد	مورد	
GG	۱۳	۲۸	
AA+AG	۹۷	۶۲	۰/۰۰۱
مجموع	۱۱۰	۹۰	

بین سن افراد شرکت‌کننده و واریانت تحت بررسی، ارتباط معناداری مشاهده نشد (p=۰/۱۲). به‌منظور احتمال قرارگیری در تعادل هاردی وینبرگ (HWE[1]) از سایت (www.dr-petrek.eu › documents › HWE) استفاده گردید که نتایج میزان احتمال ۰/۵۷۴ را برای فراوانی ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه نشان داد (p<۰/۰۵).

بحث

با توجه به اینکه پلی‌مورفیسم‌ها می‌توانند به‌عنوان یک ابزار نسبتاً کارآمد در بررسی تغییرات ژنتیک و استعداد ابتلاء به بیماری مورد استفاده قرار بگیرند و همچنین مطالعات گوناگونی دخالت خانواده ژن p53 را در تولید مثل نشان می‌دهند (۲۴)، نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، نشان داد که موتاسیون rs4648551 می‌تواند در سقط مکرر زنان جمعیت استان‌های شمال غربی کشور مؤثر باشد. یک توضیح احتمالی برای تناقض مشاهده شده بین مطالعات انجام شده بر روی پلی‌مورفیسم ژن P73، در کشورهای مختلف می‌تواند وجود توزیع جغرافیایی و نژادی مختلف این پلی‌مورفیسم باشد. همچنین در هر یک از این مطالعات معیارهای مختلفی در انتخاب گروه زنان بیمار وجود دارد که این امر می‌تواند منجر به نتایج ضدونقیض در بررسی‌های مختلف گردد. نقطه قوت مطالعه حاضر، دقت در انتخاب و رعایت کامل بیماران واجد شرایط به مطالعه بود. این افراد دارای حداقل ۲ بار سقط مکرر بوده و از نظر آزمایشات آناتومی و سیتوژنتیکی به‌طور کامل طبیعی بوده و مشکل بالینی قابل توجهی در پرونده پزشکی خود نداشته و هر بیماری که واجد علت احتمالی برای سقط مکرر بود، غیرمرتبط با دلایل ژنتیکی بود و از جامعه آماری حذف گردید، لذا در این افراد هیچ‌گونه دلیل سیتوژنتیکی و آناتومی در آزمایشات آنها مشاهده نشده و بنابراین این فرضیه که تأثیر پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در بروز علت سقط مکرر خودبه‌خودی اثرگذار می‌باشد را قوت می‌بخشید، اما نباید از نظر دور داشت که ارتباط یک بیماری با یک عامل ژنتیکی، به انجام مطالعات زیاد با تعداد جمعیت‌های بالا از قومیت‌های متفاوت از کشورهای دیگر مورد نیاز است.

یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر را می‌توان در تعداد نمونه‌های بیماران در نظر گرفت.

تأثیر اعضای خانواده p53 در عملکردهای سلولی و تأثیر آنها روی سرطان، رشد و ایمنی ذاتی، شرایط تنش، اسیداتیو و پیری روشن شده است. در برخی مطالعات مشاهده شده که در دستگاه تولید مثلی زن، p63 کیفیت بقای مخزن تخمک را کنترل می‌کند؛ به صورتی‌که پروتئین p63 و به‌طور اختصاصی ایزوفورم TAp63 مرتبط با آن، در سلول‌های جنسی ماده در طی خروج از مرحله میوز بیان می‌شود. این ایزوفرم درصورتی‌که DNA آسیب دیده باشد، مرگ سلول تخمک را تحریک می‌کند که از دیدگاه مکانیسم مولکولی، در قدم اول p63 فسفریله شده و سپس با اتصال به p53 و تشکیل یک کمپلکس، مرگ سلول تخمک را القاء می‌کند. p73 تقسیم را در بلاستوسیست اولیه که تحت میتوز طبیعی است، تضمین می‌کند و p53 تنظیم کاشت را در تخم بارور شده بر عهده دارد (۱۲). در واقع اثرات اعضای این خانواده روی مخزن فولیکول، نرخ تخمک‌گذاری و کیفیت تخمک، نشان‌دهنده آن است که این خانواده ژنی نقش مهمی در کنترل تولید مثل مادر دارد. مشاهده شده است که از دست دادن ژن‌های p53، p63 و p73 در موش ماده منجر به کاهش بارداری می‌شود؛ به‌طوری‌که محصول ژن p53، تولید مثل مادری را در مرحله لانه‌گزینی (کاشت بلاستوسیست) تنظیم می‌کند و p73 وp63 نقش مهمی در کنترل کیفیت تخمک بر عهده دارند (۲۵).

در این مطالعه یکی از واریانت‌های ژن p73 که یکی از اعضای خانواده ژن p53 می‌باشد، مورد آنالیز قرار گرفت. اهمیت عملکردی این ژن در موش‌هایی که با نقص در p73 همراه بودند، نشان داد که ژن p73 در مراحل مختلف تولید مثل اهمیت تنظیمی دارد (۲۶، ۲۷). به‌علاوه، نتایج سایر مطالعات حاکی از این است که موش با نقص در هر دو ایزوفورم TA و ΔN در p73 به‌طور کلی نابارور است (۲۰).

مشخص شده است که p73 در تنظیم توسعه سیستم عصبی و تمایزی و نمو نقش مؤثری دارد. در میان نقص‌های عصبی مطالعه شده، موش نر واجد نقص

[1] Hardy-Weinberg equilibrium

عملکرد در p73 تمایل به جفت‌گیری با ماده‌های بالغ را نداشته و از این حیث نابارور می‌باشد. موش فاقد ایزوفورم TAp73، فقط در جنس ماده با مکانیسم‌های مختلفی باعث بروز ناباروری می‌شود (۱۹). موش ماده با نقص در ایزوفورم TAp73 در مراحل مختلف تولید مثل مادری نارسایی دارد، از جمله این نارسایی‌ها می‌توان به کاهش مخزن فولیکولی،کاهش توانایی تخمک‌گذاری و کاهش کیفیت تخمک اشاره کرد (۲۰).

در انسان، علل ناباروری می‌تواند به هر دو جنس مذکر و مؤنث مربوط باشد، اما تقریباً ۶۰٪ ناباروری ناشی از شرایط زنان گزارش شده است. در میان علل ناباروری زنان، اختلال تخمدان یک علت شایع تلقی می‌شود. کیفیت و کمیت مخزن فولیکول اولیه در حفاظت از باوری زنان نقش کلیدی دارد. تخمک‌ها به‌عنوان یک جمعیت محدود در یک مرحله آسیب‌پذیر تتراپلوئیدی برای زمانی طولانی، متوقف شده‌اند و با افزایش سن زنان، عملکرد تخمدان کاهش می‌یابد و نرخ آنیوپلوئیدی تخمک افزایش می‌یابد. مطالعه روی موش نشان داده که ایزوفورم TAp73 در نگهداری پایداری ژنومی درگیر است. سطح این ایزوفورم با افزایش سن، کاهش می‌یابد که ممکن است باعث افزایش آنیوپلوئیدی در تخمک‌های مسن گردد (۱۹). در فنگ و همکاران (۲۰۱۱)، مطالعه ای روی تنظیم تولید مثل توسط ژن p53 و اعضای خانواده آن بر روی موش صورت اجرا شد. این مطالعه بر روی ۱۴ پلی‌مورفیسم در ژن p53، یک پلی‌مورفیسم در ژن p63 (rs2279744) و ۲ پلی مورفیسم در ژن p73 (rs4648551 وrs6695978) اجرا و نتایج آن نشان داد که خانواده p53 به‌طور قابل توجهی در کارآمد بودن باروری انسان نقش مؤثری بازی می‌کنند (۲۸). طی تحقیق دیگری که فنگ و همکاران (۲۰۱۱) بر روی تنظیم کننده‌های مسیر ژنp53 در باروری انسان انجام دادند، نتایج در ارتباط کدون ۷۲ (rs1042522) برای ژن p53 نشان داد که پرولین منجر به تولید سطح پایینی از LIF شده و به‌عنوان یک عامل خطر برای کاشت بلاستوسیست در جمعیت سفید پوستانی که IVF را با موفقیت پشت سر گذاشته‌اند تلقی می‌گردد. پلی مورفیسم در ژن‌های p63 و p73 در بیماران IVF نیز نشان داد که این واریانت‌های ژنتیکی نیز تحت انتخاب تکاملی است. در مورد p63 در هر ۲ گروه مسن و جوان تأثیرگذاری یکسانی داشته و نشان‌دهنده آن است که p63 عملکرد دیگری علاوه بر نقش در حفظ تمامیت سلول‌های جنسی دارد (۲۷).

در مطالعه فنگ و همکاران (۲۰۱۱) در ایالت نیوجرسی آمریکا که روی پلی‌مورفیسم (rs4648551 A>G) در ژن p73 در زنان نابارور انجام شد؛ نشان داد که فراوانی آلل G به‌طور قابل توجهی در زنان نابارور مسن (بالای ۳۵ سال) بیشتر می‌باشد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (۲۸). در تضاد با نتایج مطالعه حاضر، نتایج مطالعه چن و همکاران (۲۰۱۵) در کشور چین که بر روی زنان برزیلی با سن کمتر از ۳۷ سال تحت درمان IVF/ICSI انجام شد، حاکی از ارتباط بین ژنوتیپ AA و افزایش ۲ برابری خطر ریسک کاهش ذخیره تخمدانی (شامل ORPI: شاخص پیش‌بینی پاسخ تخمدان، AMH: سطح هورمون ضد مولر، AFC: تعداد فولیکول آنترال) بود (۲۹). در مطالعه آنها بیمارانی که واجد ژنوتیپ AA بودند، سطوح AMH، AFC و ORPI کمتری از گروه کنترل داشتند و با آنالیز حاصل شده از آلل‌ها مشخص شد که افزایش آلل A در بیماران، باعث کاهش ذخیره تخمدانی می‌شود. به‌نظر می‌رسد علت گزارش چنین نتیجه‌ای به‌دلیل عدم وارد کردن زنان با میانگین سنی بالاتر بوده است که با هدف به حداقل رساندن اثر سن بر روی ذخیره تخمدانی بوده است.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعات حاضر فراوانی rs4648551 در ژن P73 در افراد مبتلا به سقط بیشتر از افراد سالم بود و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار به‌دست آمد. با توجه به عدم وجود گزارشی جهت آگاهی از فراوانی پلی‌مورفیسم rs4648551 در جمعیت زنان ایرانی، اطلاعات به‌دست آمده می‌تواند در غنی‌سازی پایگاه داده‌های اطلاعات ژنتیکی و نیز پیش‌آگهی ژنتیکی در خصوص ارزیابی میزان خطر بروز سقط مکرر با دلایل ناشناخته بر اساس اطلاعات جمعیتی مؤثر باشد. همچنین از این پلی‌مورفیسم می‌توان به‌عنوان یکی از مارکرهای غربالگری ژنتیکی به منظور

محاسبه ریسک خطر بروز سقط مکرر در پانل های غربالگری استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر مستخرج از پایان‌نامه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با شماره ثبت ۱۵۷۳۰۵۰۳۹۴۲۰۰۶ می‌باشد. بدین‌وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) و همچنین مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی نور تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1.Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. Arch Gynecol Obstet 2005; 272(2):95-108.
2.Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: an overview of genetic and non-genetic backgrounds. International Journal of Human Genetics 2006; 6(2):109.
3.Sierra S, Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. Semin Reprod Med 2006; 24(1):17-24.
4.Zonouzi AP, Farajzadeh D, Bargahi N, Farajzadeh M. Apolipoprotein E genotyping in women with recurrent pregnancy loss: an in silico and experimental hybrid study. Gene 2014; 549(2):209-13.
5.Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: aetiology, management and prognosis. Hum Reprod Update 2002; 8(5):463-81.
6.Azani A, Hosseinzadeh A, Azadkhah R, Zonouzi AAP, Zonouzi AP, Aftabi Y, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene variants (-786 T>C, intron 4 b/a VNTR and 894 G>T) with idiopathic recurrent pregnancy loss: A case-control study with haplotype and in silico analysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2017;215:93-100.
7.Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. Reprod Biomed Online 2006; 12(3):322-7.
8.Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, et al. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. J Reprod Immunol 2003; 58(1):69-77.
9.Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? Am J Reprod Immunol 2006; 56(4):230-6.
10. Nair RR, Khanna A, Singh K. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population. Reproductive Sciences 2012; 19(2):210-5.
11. Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Ghorbian S, Sadaghiani MM, Farzadi L, Ghasemzadeh A, et al. The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. J Assist Reprod Genet 2013; 30(10):1353-9.
12. Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. Nat Rev Mol Cell Biol 2011; 12(4):259-65.
13. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res 1998; 8(12):1229-31.
14. Kwok PY, Deng Q, Zakeri H, Taylor SL, Nickerson DA. Increasing the information content of STS-based genome maps: identifying polymorphisms in mapped STSs. Genomics 1996 ; 31(1):123-6.
15. De Laurenzi V, Costanzo A, Barcaroli D, Terrinoni A, Falco M, Annicchiarico-Petruzzelli M, et al. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. J Exp Med 1998; 188(9):1763-8.
16. De Laurenzi VD, Catani MV, Terrinoni A, Corazzari M, Melino G, Costanzo A, et al. Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. Cell Death Differ 1999; 6(5):389-90.
17. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. Genes Dev 2005; 19(18):2122-37.
18. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. Mol Cell 1998; 2(3):305-16.
19. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. Mol Cancer Res 2004; 2(7):371-86.
20. Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. FASEB J 2011; 25(7):2245-55.
21. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. Genes Dev 2008; 22(19):2677-91.
22. Ali SM, Mahnaz S, Mahmood T. Rapid genomic DNA extraction (RGDE). Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2008; 1(1):63-65.

23. Miranzadeh-Mahabadi H, Miranzadeh-Mahabadi H, Nikpour P, Emadi-Baygi M, Kelishadi R. Comparison of TaqMan Real-Time and Tetra-Primer ARMS PCR Techniques for Genotyping of Rs 8066560 Variant in Children and Adolescents with Metabolic Syndrome. Adv Clin Exp Med 2015; 24(6):951-5.
24. Tang W, Zhou X, Chan Y, Wu X, Luo Y. p53 codon 72 polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. J Assist Reprod Genet 2011; 28(10):965-9.
25. Hu W. The role of p53 gene family in reproduction. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009; 1(6):a001073.
26. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. Nature 2000; 404(6773):99-103.
27. Nedelcu AM, Tan C. Early diversification and complex evolutionary history of the p53 tumor suppressor gene family. Dev Genes Evol 2007; 217(11-12):801-6.
28. Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, et al. Regulation of female reproduction by p53 and its family members. The FASEB Journal 2011; 25(7):2245-55.
29. Chen H, Yang X, Wang Z. Association between p53 Arg72Pro polymorphism and recurrent pregnancy loss: an updated systematic review and meta-analysis. Reproductive biomedicine online 2015; 31(2):149-53.