بررسی همراهی بین پلی‌مورفیسم has-miR-125 rs12976445 در استعداد ابتلاء به سقط مکرر با دلایل ناشناخته در زنان ایرانی

سارا نعمتی واحدی[۱]، دکتر بابک خیرخواه[۲*]، دکتر علی اکبر ملکی‌راد[۳]

۱. دانشجوی دکتری زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران.
۲. استادیار گروه میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بافت، بافت، ایران.
۳. دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۰۸/۰۷

خلاصه

مقدمه: بسیاری از مطالعات جدید در ارتباط با دوره پسا-لانه‌گزینی و بقای بارداری، حاکی از آن است که microRNAها نقش اساسی در تنظیم مسیرهای زودرس منجر به سقط و نارسایی در لانه‌گزینی را بر عهده دارند. miR-125 بر روی کروموزوم 19q13.41 قرار گرفته و نقش مهمی در تکامل ارگان دارد. دو ژن هدف miR-125، شامل ERBB2 و LIF در تمایز سلول‌های تروفوبلاستی و رگ‌زایی درگیر می‌باشند. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط احتمالی پلی‌مورفیسم has-miR-125 T> C در استعداد ابتلاء به سقط مکرر با دلایل ناشناخته در زنان ایرانی انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه مورد- شاهدی ۱۱۶ زن با سابقه حداقل دو سقط مکرر و ۸۹ زن غیرمبتلا با سابقه داشتن دو بارداری موفق و بدون سابقه سقط مورد مطالعه قرار گرفتند. مولکول DNA با استفاده از روش RGDE تخلیص و سپس ژنوتایپینگ با استفاده از روش Tetra ARMS اجرا گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون کای دو انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در مطالعه حاضر فراوانی ژنوتیپ‌های TT، TC و CC در پلی‌مورفیسم rs12976445 در زنان مبتلا به سقط به‌ترتیب ۵۰/۸۶٪، ۴۲/۲۵٪ و ۶/۸۹٪ و در زنان سالم ۵۸/۴۳٪، ۳۹/۳۳٪ و ۲/۲۴٪ بود. بین پلی‌مورفیسم rs12976445 و سقط مکرر هیچ ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (p=۰/۲۳۸).

نتیجه‌گیری: بین پلی‌مورفیسم rs12976445 و سقط مکرر خودبه‌خودی ارتباط معنی‌داری وجود ندارد.

کلمات کلیدی: چندشکلی تک‌نوکلئوتیدی، miR-125، سقط‌های مکرر خودبه‌خودی، Tetra ARMS PCR

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر بابک خیرخواه؛ دانشگاه آزاد اسلامی واحد بافت، بافت، ایران. **تلفن:** ۰۳۴-۴۲۴۲۲۰۲۸؛ **پست الکترونیک:** Babakkheirkhah@yahoo.com

مقدمه

با توجه به اهمیت زادآوری و بقای نسل در دنیای امروزی، سقط مکرر جنین از جمله موضوعات مطرح برای پژوهشگران می‌باشد. سقط مکرر جنین (RPL)[1] به‌صورت دو یا تعداد بیشتری از دست دادن حاملگی، قبل از هفته ۲۰ بارداری رخ می‌دهد و در حال‌حاضر در حدود ۵-۱٪ زنان دچار آن هستند (۱). از مهم‌ترین دلایل شناخته شده سقط می‌توان به ناهنجاری‌های کروموزومی، ناهنجاری‌های ژنی، ناهنجاری‌های ساختاری رحم، بیماری‌های ایمونولوژیکی، ترومبوفیلی‌های ارثی یا اکتسابی، بیماری‌های هورمونی مانند مشکلات تیروئیدی، دیابت ملیتوس کنترل نشده، بیماری‌هایی مانند سندرم آنتی‌بادی آنتی‌فسفولیپید، عوامل عفونی، کیفیت و ویژگی‌های اسپرم، سن والدین، عوامل محیطی و سبک زندگی اشاره کرد. تمام این عوامل فقط علت ۵۰٪ از سقط‌ها را توجیه می‌کند و علی‌رغم همه پیشرفت‌ها، هنوز علت سقط در ۵۰٪ موارد دیگر ناشناخته باقی‌مانده است (۲). نقص ژنتیکی به‌عنوان یکی از عوامل مهم ناشناخته سقط مکرر جنین مطرح می‌باشد. تاکنون تحقیقات گسترده‌ای برای کشف مکانیسم‌های مولکولی دقیق درگیر در روند سقط مکرر انجام شده است (۳-۸). در کنار نقش اولیه فاکتورهای رونویسی[2]، در چند سال اخیر خانواده دیگری از عناصر تنظیمی در میان ژن‌ها نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند و نشان داده شده که نقشی مؤثر بر فعالیت و عملکرد سلول‌ها بر عهده دارند. عناصر تنظیمی اپی‌ژنتیکی در گروه RNAهای کوچک غیر کدکننده قرار گرفته‌اند (۹). رونویسی mRNA از روی DNA ژنومی و ترجمه آن به پروتئین، محور اصلی و غیرقابل تغییر در زیست‌شناسی مولکولی است، اما این اصل به‌تازگی دچار چالش شده است و دلیل آن، برخی قطعات DNA می‌باشد که پیش‌ساز mRNA از روی آنها رونویسی می‌شود، ولی لزوماً به پروتئین ترجمه نمی‌شود و در تنظیم بیان ژن‌های دیگر و عملکرد آنها دخالت دارند. چنین بخش‌هایی از DNA که پس از رونویسی به جای RNA کد کننده مستقیماً به‌عنوان RNA تنظیم‌کننده عمل می‌کنند را RNA غیر کدکننده[3] می‌نامند. در میان عوامل مؤثر در بروز سقط مکرر جنین، microRNAها جزء زیرگروه بزرگی از RNAهای غیرکدکننده ۲۰-۱۸ نوکلئوتیدی هستند و در تمامی فرآیندهای تنظیم و تکثیر و تمایز سلولی، از جمله مسیرهای رشد و نمو جنینی نقش دارند که می‌تواند حائز اهمیت باشد (۱۰).

تا تاریخ جولای ۲۰۱۸ در مجموع ۱۹۱۷ پیش‌ساز لکوس‌های واجد توالی microRNA در انسان شناسایی شده است که به‌طور تقریبی ۶۰٪ از ژن‌های فعال انسانی توسط آنها تنظیم می‌گردد. وجود پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی در توالی microRNAها می‌تواند بر روی عملکرد آنها اثر داشته باشد که این اثر در سه فرآیند تبدیل پیش‌ساز microRNA به miR بالغ و تغییر در میل اتصال ناشی از وجود واریانت‌های ژنتیکی در محل اتصال miR به UTR ژن هدف و همچنین تنظیم اپی‌ژنتیکی بر روی ژن‌های بیان‌کننده miRها صورت می‌گیرد (۱۱). گزارش‌های متعددی همراهی تغییرات بیانی microRNAها با سقط مکرر را نشان داده است (۱۲, ۱۳). microRNAهای زیادی در وقایع مختلف بارداری از جمله لانه‌گزینی جنین، حاملگی خارج رحمی، پره‌اکلامپسی، زایمان زودرس، وزن کم جنین هنگام تولد، سقط خودبه‌خودی و پاسخ‌های ضدالتهابی نقش دارند و در هرکدام از این وقایع بر اساس ژن‌های هدف نقش خاصی را دارند (۱۴). نتایج مطالعه بارچیتا و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی زنان مبتلا به سقط مکرر جنینی انجام شد، نشان داد که miR-133a با افزایش بیان خود سبب کاهش ترجمه HLA-G می‌گردد و از این طریق در تحمل جنین توسط سیستم ایمنی مادر نقش کلیدی دارد و در صورت کاهش بیان miR-133a در نهایت می‌تواند منجر به سقط خودبه‌خودی شود (۱۵). به‌علاوه در مطالعه لی دی و همکاران (۲۰۱۶) که بر روی زنان چینی واجد علائم سقط مکرر خودبه‌خودی انجام شد، نشان داده شد که

[1] recurrent pregnancy loss
[2] Transcription factors
[3] Non-coding RNAs

تغییرات بیانی گروه ۵ تایی از microRNAهای کلیدی شامل miR-34a، miR-155، miR-141، miR-125a و miR-125b در سلول‌های ایمنی (NK cell) به‌طور معنی‌داری با بروز سقط مکرر خودبه‌خودی ارتباط نشان دادند (۱۶). با توجه به گستره وسیع فعالیت microRNAها در مسیرهای پیام‌رسانی و همچنین اندام‌های مختلف از جمله دستگاه تولید مثل زنان، پرداختن به این RNAهای کوچک تنظیمی،گزینه مناسبی به‌نظر می‌آید. مطالعات نشان داده‌اند که وجود تغییرات پلی‌مورفیسم تک نوکلوتیدی (SNP)[1] در ژن‌های مسئول تولید پروتئین خاص و یا درگیر در مسیرهای مرتبط با رشد و نمو جنینی با سقط مکرر جنین ارتباط معنی‌داری را نشان می‌دهد (۱۷). SNP در واقع تنوع توالی‌های DNA در یک نوکلئوتید در بین اعضای یک گونه می‌باشد که 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 (۱۸, ۱۹). بیش از ۹۰٪ از تغییرات نوکلئوتیدی در سطح DNA، را تغییرات تک‌نوکلئوتیدی به خود اختصاص می‌دهند (۱۸). خانواده miR-125 یک گروه از microRNAهای به‌شدت حفاظت شده‌اند و متشکل از دو زیرواحد مهم (rs 41275794) miR-125a و (rs 12976445) miR-125b می‌باشد که دارای موقعیت کروموزومی کاملاً مجزا هستند.

miR-125 در انواعی از کارسینوماها و بیماری‌های دیگر به‌عنوان سرکوبگر یا پیش‌برنده آن بیماری دخیل می‌باشد. بیان خانواده miR-125 در اکثر بافت‌ها و بخش‌های مختلف بدن مانند معده، کبد، ریه، راست روده، غدد پستانی، پروستات، تخمدان و غیره صورت می‌گیرد و تحقیقات بسیاری در ارتباط آن در زمینه سرطان اندام‌های مختلف بدن انجام شده است. از جمله سرطان تخمدان، پوست، مثانه، لوکمی لنفوسیتی و بیماری‌هایی همچون کاهش شنوایی پیش‌رونده، کراتوکونوس ارثی[2] یا برآمدگی قرنیه به همراه آب مروارید قدامی[3]، نقص اسکلتی و رشد که نشان می‌دهند با پیشگیری از بیان برخی ژن‌ها به‌عنوان یک سرکوبگر فعالیت می‌کند (۲۰-۲۲). همچنین مشاهده شده است که miR-125b در چندین سرطان نقش انکوژنی دارد. علاوه بر آن، افزایش بیان miR-125 در چندین سرطان مانند سرطان پانکراس، سرطان پروستات و سرطان الیگودندروگلیا مشاهده شده است (۲۳). یکی از نقش‌های miR-125 روی فرآیندهایی نظیر مرگ سلولی[4] و رشد سلولی از طریق مسیرهای وابسته به P53 انجام می‌شود. دو ژن هدف LIF و ERBB2 به‌واسطه miR-125 تنظیم می‌گردند و در بارداری عادی و تمایز سلول‌های تروفوبلاستی جفت نقش کلیدی دارند. اتصال miR-125 از طریق بخش Seed sequence خود به MRE[5] ژن‌های فوق می‌تواند در کاهش یا افزایش بیان ژن‌ها نقشی اساسی ایفا کند. این مطالعه با توجه به تأثیر تنظیم پلی‌مورفیسم منتخب در بیان ژن‌های هدف و عملکرد مناسب آنها در مسیرهای منتهی به سقط و عدم مطالعه فراوانی آن در ایران، برای اولین بار با هدف بررسی ارتباط همراهی پلی‌مورفیسم rs12976445[6] در ژن miR-125 در زنان ایرانی مبتلا به سقط مکرر با دلایل ناشناخته انجام شد. هدف اصلی انتخاب miR-125 در این مطالعه به‌علت نقش اساسی آن در مسیرهای رگ‌زایی و حفظ پایداری عروق خونی در رحم، کنترل مسیرهای التهابی، کنترل مسیرهای درگیر در لانه‌گزینی و آپوپتوز سلولی و ایجاد پاسخ سیستم ایمنی بدن و نیز مکانیسم‌های خودایمنی در پس زدن یا رد کردن جنین است (۲۳).

روش‌کار

در این مطالعه مورد شاهدی، ۱۱۶ زن ایرانی (با میانگین سنی ۶/۴ ±۳۳/۲ و دامنه سنی ۴۹-۲۱ سال) با داشتن سابقه دو سقط مکرر پیش از هفته بیستم بارداری و بدون علت مشخص و بدون سابقه بارداری موفق به‌عنوان

[1] Single-nucleotide polymorphism
[2] Hereditary keratoconus
[3] Anterior polar cataract
[4] Apoptosis
[5] miRNA response elements
[6] Reference SNP

گروه مورد (معیار ورود به مطالعه) و گروه کنترل، ۸۹ زن ایرانی (با میانگین سنی ۸/۴ ±۳۷/۲ و دامنه سنی ۵۲-۱۹ سال) بدون داشتن سابقه سقط مکرر و دارای حداقل دو بارداری موفق که به آزمایشگاه خصوصی در تهران مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. نمونه‌گیری به‌روش راحت[1] در نمونه‌های در دسترس انجام گرفت و حجم نمونه‌های گروه‌های مورد و شاهد بر اساس افرادی که نمونه‌گیری شده بودند و حاضر به همکاری در این پژوهش بودند، تعریف گردید. معیارهای ورود به مطالعه در افراد هر دو گروه شامل: عدم داشتن مشکلات آناتومیک در رحم (نرمال از نظر هیستروسکوپی)، فاقد مشکلات انعقادی، بدون مشکلات سیتوژنتیکی در محصولات سقط، عدم مصرف داروهای منجر به سقط، نداشتن سابقه عفونت‌های رحمی (توکسوپلاسموز) و یا اختلالات ایمونولوژیکی بود. به‌منظور انجام خون‌گیری، از تمام زنان مورد مطالعه خواسته شد تا رضایت‌نامه تدوین شده را آگاهانه امضاء نمایند. این مطالعه پس از کسب موافقت کمیته اخلاق (IR.BMSU.RBC.1395.769) دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله الاعظم (عج) در سال ۹۵-۱۳۹۴ در استان تهران انجام شد.

به منظور استخراج DNA، طراحی پرایمر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، ۵ میلی‌لیتر خون محیطی در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری و سپس بر روی کارت‌های FTA جهت بیوبانک نگهداری گردید. استخراج DNA از لکوسیت‌ها با روش نمک کلروفرم صورت گرفت و به‌جهت آنالیزهای مولکولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از استخراج DNA با روش RGDE نسبت به کنترل کیفی آن با استفاده از سنجش اسپکتوفوتومتری (نانودراپ) و الکتروفورز اقدام شد. به‌منظور تعیین صحت استخراج، تمامی DNAهای استخراج شده مورد آنالیز کیفی و کمی قرار گرفتند. طراحی پرایمر جهت ژنوتایپینگ rs12976445 در پیش‌ساز ژن miR-125 بر پایه روش Tetra ARMS (۲۴)، با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo 7، GENE Runner و Blast اجرا شد (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده در مطالعه حاضر

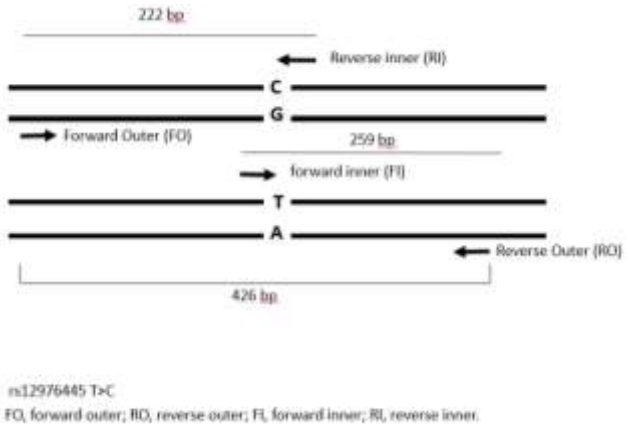
ژن	پرایمر	توالی('3-'5)	قطعه تکثیر شونده (bp)
hsa-mir-125a; rs12976445 T>C	FO	ATGAGGAGTCAGGGGTCAGAAGTCAGGC	۴۲۶
	RO	CTCTTTTCTGTCCTTGTCCCTGCATCCC	
	FI (C allele)*	TCTCTGGCTCTCAGAATGTCTCTGTGACC	۲۲۲
	RI (T allele)**	TGGGGTGGGGGTCAGAGATGGAGCTA	۲۵۹

FO, forward outer; RO, reverse outer; FI, forward inner; RI, reverse inner.

* آلل موتانت، ** آلل طبیعی

در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Tetra ARMS چهار پرایمر در یک واکنش برای تعیین ژنوتایپ استفاده می‌شود. در شروع واکنش، دو پرایمر غیر آلل - ویژه محل قرارگیری واریانت در سطح ژنومی (SNP) که پلی‌مورفیسم هدف را در برمی‌گیرد را متناسب با نوع پرایمر خارجی بسط می‌دهد (تصویر ۱).

[1] Convenient Sampling



تصویر ۱- طرح شماتیک فرآیند عملکرد واکنش Tetra ARMS. همانطور که در تصویر فوق مشاهده می‌شود قرارگیری همزمان چهار پرایمر در یک تیوپ منجر به تکثیر آلل‌های اختصاصی rs12976445 می‌گردد. اگر بیمار واجد توالی هتروزیگوت باشد، سه باند و در صورت هموزیگوت بودن، دو باند تکثیر می‌گردد.

به جهت تعیین ژنوتایپ نمونه‌های زنان RPL و شاهد، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. شرایط بهینه واکنش Tetra ARMS در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر از Master mix 2X (Ampliqon, Denmark)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها، ۲ میکرولیتر از DNA خالص‌سازی شده و ۶ میکرولیتر آب ۲ بار تقطیر تهیه گردید. برنامه حرارتی در دستگاه ترموسایکلر (BIO RAD) به‌منظور تکثیر به‌ترتیب دمای واسرشتگی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل: واسرشتگی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۰ ثانیه و مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس یک چرخه مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد (جدول ۲).

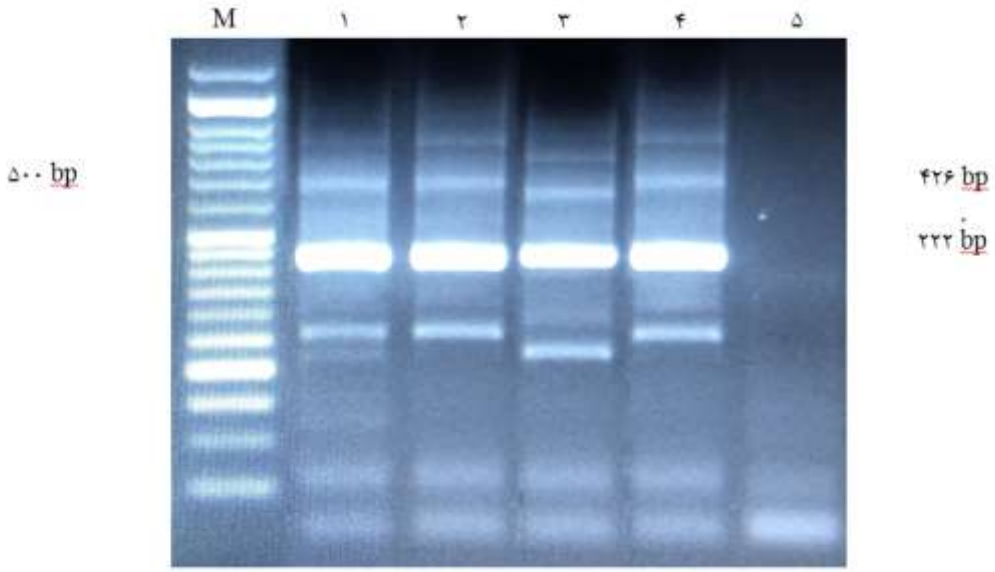
محصولات PCR به‌وسیله الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵٪ با رنگ ویژه DNA (Power load) رنگ‌آمیزی و در حضور شاهد مناسب تفکیک شد و بعد از رنگ‌آمیزی توسط تاباندن اشعه ماوراء بنفش به ژل و انعکاس درخشش فلوئورسانس قابل مشاهده گردید.

جدول ۲- مراحل انجام PCR و دمای هر مرحله از واکنش Tetra ARMS

مراحل	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)	تعداد سیکل‌ها
دناتوراسیون اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵	۱
دناتوراسیون	۳۰ ثانیه	۹۵	۳۵
اتصال	۴۰ ثانیه	۶۲	
طویل شدن	۳۰ ثانیه	۷۲	
طویل شدن نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲	۱

یافته‌ها

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل از نظر سن مشاهده نشد (p=۰/۲) و هیچ یک از افراد مورد مطالعه هیچ‌گونه سابقه عفونت رحمی و یا بیماری زمینه‌ای خاصی نداشتند. نتایج واکنش Tetra ARMS PCR همان‌طور که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود در افراد هتروزیگوت سه باند و در افراد هموزیگوت دو باند را نشان می‌دهد.



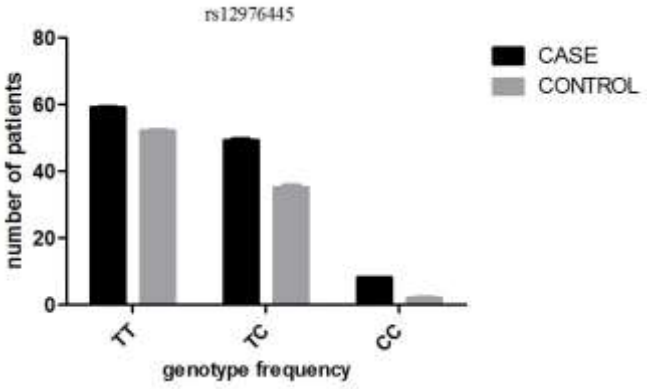
تصویر ۲- الکتروفورز محصولات Tetra-ARMA در بیماران سقط مکرر و گروه کنترل. در چاهک شماره ۵-۱ به‌ترتیب واجد ژنوتیپ‌های CT (۴۲۶ bp، ۲۲۲bp و ۲۵۹bp)، TT (۴۲۶ bp و ۲۵۹bp)، CC (۴۲۶ bp و ۲۲۲bp)، TT (۴۲۶ bp و ۲۵۹bp) و کنترل منفی (NTC)، در افراد بیمار مشاهده شد.

فراوانی ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs12976445 شامل ژنوتیپ‌های TT، TC و CC در گروه بیماران واجد علائم سقط مکرر به‌ترتیب برابر با ۵۰/۸۶٪، ۴۲/۲۵٪ و ۶/۸۹٪ و در گروه زنان نرمال ۵۸/۴۳٪، ۳۹/۳۳٪ و ۲/۲۴٪ مشاهده شد که فراوانی ژنوتیپی و آللی آن تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p=۰/۲۳۸). هیچ یک از ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs12976445 با بروز سقط مکرر خودبه‌خودی مرتبط نمی‌باشد، در بررسی نتایج، مشاهده شد که با بروز سقط مکرر جنین میزان فراوانی ژنوتیپ TT با افزایش جزئی همراه بود که در سطح احتمال ۵٪ بی‌معنی بود، این در حالی است که سایر ژنوتیپ‌ها با افزایش معنی‌داری روبرو نبودند (جدول ۳).

جدول ۳- محاسبه فراوانی ژنوتیپی و درصد فراوانی ژنوتیپی rs12976445 در گروه زنان سقط مکرر و کنترل

ژنوتیپ/آلل	گروه سقط	گروه کنترل	سطح معنی‌داری**	سطح اطمینان ۹۵٪	OR*
rs12976445			۰/۲۳۸		ND
TT	(۵۰/۸۶) ۵۹	(۵۸/۴۳) ۵۲	۰/۲۸۱	۲/۳۷۰-۰/۷۷۸	۱/۳۵۸
TC	(۴۲/۲۵) ۴۹	(۳۹/۳۳) ۳۵	۰/۶۷۴	۱/۹۸۱-۰/۶۴۳	۱/۱۲۸
CC	(۶/۸۹) ۸	(۲/۲۴) ۲	۰/۱۲۶	۱۵/۵۶۶-۰/۶۶۷	۳/۲۲۲
مجموع	(۱۰۰) ۱۱۶	(۱۰۰) ۸۹			
T	(۷۲) ۱۶۷	(۱۰۰) ۱۳۹	۰/۰۹	۱/۱۳۸-۰/۴۵۷	۰/۷۲۱
C	(۲۸) ۶۵	(۱۰۰) ۳۹	۰/۰۹	۲/۱۸۹-۰/۸۷۹	۱/۳۸۷
مجموع	(۱۰۰) ۲۳۲	(۱۰۰) ۱۷۸			

ND: Not Determined, * Odds Ratio, ** Probability value

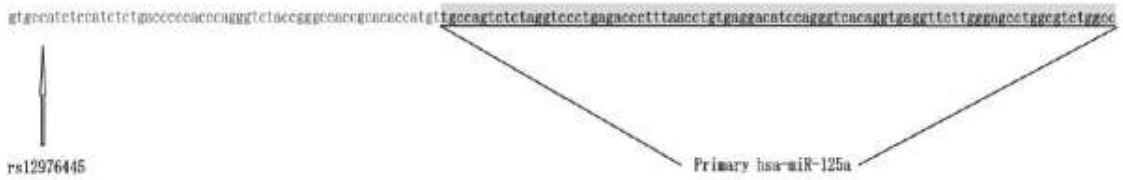


نمودار۱- فراوانی ژنوتایپ rs12976445

بحث

در این مطالعه بررسی بین فراوانی آللی و ژنوتیپ‌های پلی‌مورفیسم rs12976445 از خانواده miR-125 با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده و نتایج حاصل از آن با نرم‌افزار آماری مورد ارزیابی قرار گرفت. در مطالعه حاضر بین دو گروه زنان مبتلا به سقط و گروه غیرمبتلا از نظر سقط مکرر خودبه‌خودی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (p=۰/۲۳۸). به‌طور کلی پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن‌های miRNA می‌توانند به‌طور بالقوه در تغییرات مختلف بیولوژیکی با تأثیر بر انتخاب miRNAهای هدف و درگیر شدن در بیماری‌های مختلف مؤثر باشند (۲۵).

نقش خانواده miR-125 در عملکرد بهینه سیستم ایمنی بدن انسان در مطالعات متعددی گزارش شده است (۲۶، ۲۷). بیان فاکتورهای رونویسی سیستم ایمنی، توسط miR-125 تعدیل می‌شود که این موضوع بر اهمیت آن در تنظیم مسیرهای منجر به حفظ و پایداری حاملگی می‌افزاید. از آن‌جایی که یکی از مهم‌ترین دلایل شایع در بروز سرطان‌ها، بهم‌ریختگی در چرخه سلولی می‌باشد، پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوئیدی نیز می‌توانند در بروز سقط‌های مکرر خودبه‌خودی مؤثر باشند. به‌دلیل اثرگذاری این دسته از SNPها بر روی چرخه سلولی سلول‌های اندومتریوم و یا تکامل جنینی، علت فنوتیپ سقط مکرر باشند.



تصویر ۳- جایگاه پلی‌مورفیسم rs12976445 در ژن miR-125

ژن کدکننده miR-125 در موقعیت کروموزمی 19q13 قرار گرفته است (۲۸). این پلی‌مورفیسم در ۵۴ جفت باز در بالادست miR-125 قرار دارد (تصویر ۳). واجد فراوانی نسبی بالا و از نظر ساختاری سبب تغییر اسید آمینه‌های ساختاری پروتئینی، بر روی نواحی تنظیم‌کننده بالادست pre-miR-125a می‌شود و به‌دلیل حضور در نواحی اینترونی در تغییر ساختار فضایی دوم microRNA نقش دارد. همچنین با تنظیم پردازش pre-miR-125a به mir-125a بالغ نسبت بین این دو را کنترل می‌کند (۲۹). گزارش شده است که آلل T در پلی‌مورفیسم rs12976445 پردازش pri-miRNA و تبدیل آن به pre-miRNA را متوقف می‌کنند (۳۰). بدین‌ترتیب rs12976445 با

افزایش یا کاهش سطح miR-125a بالغ، بر بیان ژن‌های هدف این miRNA تأثیر می‌گذارد.

بر اساس مطالعاتی که اخیراً صورت گرفته است پلی‌مورفیسم‌هایی که در microRNAها قرار گرفته‌اند، در افزایش و یا کاهش قدرت و میل اتصال microRNAها به UTR در ژن هدف خود نقش اثرگذاری داشته باشند. در مطالعه حاضر از چندین پایگاه شامل miRBase (http://microrna.sanger.ac.uk)، miRNASNP (http://www.bioguo.org/miRNASNP/index.php)، پایگاه داده ژن‌های هدف microRNAهای انسانی (http://www.microrna.org)، miRdSNP (http://mirdsnp.ccr.buffalo.edu)، PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertebrate.cgi) به‌منظور پیش‌بینی ژن‌های هدف miR-125 که می‌تواند نقش این miR را در بروز فنوتیپ RPL توضیح دهد، استفاده گردید. دو ژن بسیار مهم از جهت نحوه عملکرد در گروه هدف miR-125، ژن‌های LIF و ERRBB2 می‌باشند که در درون سیتوپلاسم سلول از طریق نواحی UTR (Untranslated region) خود هدف miR-125 قرار می‌گیرند. ژن LIF در رشد و تمایز سلول‌های تروفوبلاست جفتی نقش دارد. پروتئین LIF به واسطه اتصال به پروتئین LIFR و gp130 نقش خود را در حاملگی عادی ایفا می‌کند (۳۰). همچنین، LIF یکی از مهم‌ترین القاءکننده‌های مسیر Jak/STAT نیز می‌باشد. اعضای خانواده LIF در مسیرهای سلولی شامل تحریک فاز حاد کبدی و یا تحریک سلول‌های B واجد نقش اساسی بوده؛ به‌طوری‌که نشان داده شده است که با غیرفعال کردن این خانواده پروتئینی و نیز کاهش بیان آن منجر به بیماری‌های خودایمنی می‌گردد (۳۱). علاوه بر ژن LIF، یکی دیگر از تارگت‌های miR-125، ژن ERBB2 است. ERBB2 پروتئین فاکتور رشد اپیدرمی بوده که مسئول تمایز سلول‌های تروفوبلاست پس از لانه‌گزینی جنینی است. این پروتئین، رگ‌زایی و تهاجم را با افزایش رگ‌زایی تحریک می‌کند (۳۲). از تنظیم خارج شدن بیان miR-125، باعث دفع سلول تخم در مرحله لانه‌گزینی شده که خود یکی از دلایل اصلی RPL است. حضور rs12976445 در بالادست ناحیه کدکننده miR-125 می‌تواند در ایجاد اختلاف در شدت بیان و نیز تغییر در پردازش pri-miRNA به pre-miRNA و یا کپی از miR-125 مؤثر باشد (۳۳).

در مطالعه الشرفا و همکار (۲۰۱۶) که به بررسی بیان شش microRNA در زنان مبتلا به سقط مکرر پرداختند، نتایج مطالعه آنان نشان داد که miR-21 و miR-126به‌طور بالقوه‌ای در مسیر مرتبط با سقط از طریق کاهش بیان خود درگیر می‌باشند (۳۴). تغییر نوکلئوتیدی که باعث افزایش بیان miR-125 شود، می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطانی را افزایش داده و نیز مهاجرت و متاستاز آنها را سرعت بخشد. به‌علاوه، بیان ژن miR-125 در بیماران دارای سرطان مجاری گوارشی به‌ویژه معده افزایش پیدا می‌کند که به منجر به متاستاز می‌شود (۳۵).

علاوه بر این، در مطالعه وانگ و همکاران (۲۰۱۲)، افزایش ۳۰ برابری miR-133a در زنانی که در هفته ۷ بارداری سقط عمدی را تجربه کرده بودند، گزارش شد. این نتایج اثبات می‌کند که miR-133a احتمالاً از طریق تنظیم HLA-G که در حالت طبیعی در هفته ۷-۶ بارداری جهت برقراری تولرانس بین مادر و جنین افزایش پیدا می‌کند، به‌عنوان یک مهارکننده عمل می‌کند (۳۶). علاوه بر مطالعاتی که ناشی از بررسی ارتباط بیانی microRNAها و سقط مکرر بودند، مطالعات متعددی حاکی از ارتباط چندشکلی‌های نوکلئوتیدی با سقط می‌باشد. مطالعه هیونگ و همکاران (۲۰۱۳) بر روی زنان کره جنوبی که از مشکلات ناشی از سقط مکرر با دلایل ناشناخته رنج می‌بردند، انجام شد، نشان داد که پلی‌مورفیسم‌های miR196aCC و miR-199AG+GG دارای شیوع بالاتری نسبت به زنان سالم در همین جمعیت می‌باشد (۲۴، ۳۲، ۳۷).

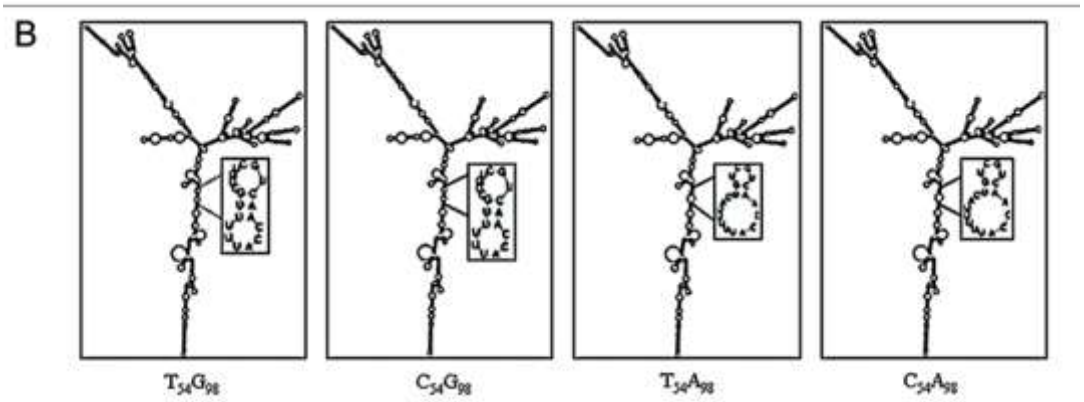
گراسمن و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که miR-125 در تخمک‌گذاری در انسان واجد نقش می‌باشد.

تحریک تخمک توسط hCG[1] منجر به کاهش بیان miR-125 در طول تخمک‌گذاری شده که به‌دنبال آن منجر به افزایش بیان Fyn (تیروزین کیناز خانواده src) شده و در نهایت منجر به مهاجرت فولیکولی می‌گردد (۳۸).

مطالعه یی هو و همکاران (۲۰۱۴) که در جمعیت زنان چین صورت گرفت، نشان داد که عملکرد موتاسیون pri-miR-125 با کاهش بیان و تأثیر بر ژن‌های مهم دیگر که در رشد نمو جنین دخیل هستند، می‌تواند منجر به مرگ جنین یا ناهنجاری جنین شود. در مطالعه آنها، بررسی سایت جهش pri-miR-125a با دو پلی‌مورفیسم rs12976445 و rs41275794 همزمان بود و تجزیه و تحلیل آنها نشان داد که جهش A.G بیان miR-125a بالغ را کاهش می‌دهد و اثر بیشتری در مهار بیان ژن هدف می‌گذارد. جهش pri-miR-125a می‌تواند ظرفیت تهاجمی سلول‌های استرومای آندومتر (ESCs) را افزایش دهد و باعث اختلال در بیان miR-125a شود که در نتیجه آن رشد جنینی، تکثیر سلولی و مهاجرت سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۹).

همچنین مطالعه دیگر یی هو و همکاران (۲۰۱۱) که با هدف بررسی پلی‌مورفیسم‌های miR-125 در زنان چینی دارای سقط مکرر انجام شد، نشان داد در میان ۵ پلی‌مورفیسم شناخته شده مؤثر در miR-125 که نقش مهمی در لانه‌گزینی و تجزیه جنین دارند، دو پلی‌مورفیسم rs41275794 (p=۰/۰۰۰۵) و rs12976445 (p=۰/۰۰۱) با خطر افزایش سقط مکرر در ارتباط بودند. در بررسی‌های آنها میزان توزیع rs12976446 به‌طور ناهمگن بوده است. آنها با بررسی‌های هاپلوتایپی میزان کاهش سطح بیان در هاپلوتپ A-T را در مقایسه با G-A در rs41275794 و T-C در rs12976445 (تصویر-۴) مؤثرتر در ابتلاء به سقط مکرر دانستند(۳۰).

به‌طور قطعی نمی‌توان گفت که نتایج مطالعه حاضر که با هدف بررسی درصد فراوانی ژنوتیپ rs12976445 در زنان مبتلا به سقط مکرر صورت گرفت، با یافته‌های مطالعه یی هو و همکاران (۲۰۱۱) ناهمسو بوده است، زیرا نتایج یافته‌های ایشان برخلاف یافته‌های مطالعه حاضر به‌صورت هاپلوتیپی بوده است و بازه جمعیت مورد بررسی توسط آنها بیشتر از بازه جمعیتی این مطالعه بوده است و عدم معنی‌داری حاکی از تأثیر کمتر این پلی‌مورفیسم در بروز علائم سقط مکرر در جمعیت زنان ایرانی مبتلا به سقط بوده است(۳۰).



تصویر۴- شماتیکی از miR-125a به همراه پلی مورفیسم‌هایش (۳۰)

[1] Human Chorionic Gonadotropin

بنابراین، مکانیزم‌های مولکولی اصلی بین روابط ژنتیکی miRNA-SNP با ایجاد RPL پیچیده هستند و ممکن است اطلاعات بیشتری برای بررسی نتایج ترکیبات هاپلوتایتی در شرایط فیزیولوژیکی با بروز RPL در جمعیت‌های قومی مختلف نیاز باشد (۲۱).

با توجه به اینکه هیچ گزارش مشابهی از فراوانی پلی‌مورفیسم rs12976445 در جمعیت زنان ایرانی وجود ندارد، یکی از اهداف این مطالعه، بررسی فرضیه احتمالی نقش پلی‌مورفیسم مطرح در miR-125 در بروز سقط مکرر بود. نقطه قوت این مطالعه، دقت در انتخاب افراد واجد شرایط بود؛ به‌طوری‌که در گروه مورد زنان دارای حداقل دو بار سقط مکرر بوده و از نظر بررسی‌های آناتومی و سیتوژنتیکی به‌طور کامل طبیعی بوده و مشکل بالینی قابل توجهی در پرونده پزشکی خود نداشته و در غیر این‌صورت از جامعه آماری حذف شدند. بنابراین این فرضیه که پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی در بروز علت سقط مکرر خودبه‌خودی اثرگذار می‌باشند را قوت بخشید، اما عدم معنی‌داری بین تغییرات پلی‌مورفیسم miR-125 در جمعیت زنان ایرانی این فرضیه را نیز تقویت می‌کند که احتمالاً نقش تنها یک microRNA نمی‌تواند منجر به عامل مداخله‌گر اثرگذار در بروز سقط مکرر باشد. به‌علاوه، افزایش تعداد زنان واجد شرایط سقط مکرر (افزایش حجم نمونه) در گروه کنترل و سقط می‌تواند در افزایش قدرت مطالعه اثرگذار باشد. تنوع قومیتی در جمعیت زنان تهران که در مطالعه وارد شدند و نیز عدم دسترسی به یک پایگاه داده بومی جهت برآورد نسبی از فراوانی آللی پلی‌مورفیسم‌های شایع، یکی دیگر از چالش‌های مطالعه حاضر تلقی می‌شود. بررسی بیان miR-125 در خون و نیز بافت رحمی زنان واجد علائم سقط مکرر می‌تواند در ایجاد درک بهتری از مکانیسم مولکولی منجر به سقط و یا مقایسه آن در شرایط متفاوت کمک‌کننده باشد.

همچنین پیشنهاد می‌گردد که جهت ارزیابی تصویری روشن‌تر از مکانیسم‌های درگیر در ایجاد سقط در زنان یک پروفایل کامل از پلی‌مورفیسم‌های درگیر در نواحی اتصالی miRهای شناخته شده در گروه زنان واجد علائم سقط مورد آنالیز قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

پلی‌مورفیسم rs12976445 در جمعیت زنان ایرانی مبتلا به سقط مکرر ارتباط معنی‌داری را با گروه کنترل نشان نداد و با توجه به عدم وجود مطالعه‌ای مشابه جهت بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم rs12976445 در ایران، اطلاعات به‌دست آمده از این تحقیق می‌تواند در تقویت اطلاعات ژنتیکی و تعریف پنل‌های تشخیصی سقط مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از راهنمایی‌های واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان بقیه‌الله (عج) و همکاری آزمایشگاه خصوصی در تهران و از همکاری ارزشمند سرکار خانم مهشید شهرزاد تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. García-Enguídanos A, Calle ME, Valero J, Luna S, Domínguez-Rojas V. Risk factors in miscarriage: a review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2002; 102(2):111-119.
2. Kamali M, Hantoushzadeh S, Borna S, Neamatzadeh H, Mazaheri M, Noori-Shadkam M, et al. Association between Thrombophilic Genes Polymorphisms and Recurrent Pregnancy Loss Susceptibility in the Iranian Population: a Systematic Review and Meta-Analysis. Iran Biomed J 2018; 22(2):78-89.
3. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. Reprod Biomed Online 2006; 12(3):322-327.
4. 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.
5. 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):230-236.
6. Nair RR, Khanna A, Singh K. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population. Reprod Sci 2012; 19(2):210-215.

7. 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.
8. 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.
9. Chen TC, Hou HA, Chou WC, Tang JL, Kuo YY, Chen CY, et al. Dynamics of ASXL1 mutation and other associated genetic alterations during disease progression in patients with primary myelodysplastic syndrome. Blood Cancer J 2014; 4(1):e177.
10. Fellmann C, Hoffmann T, Sridhar V, Hopfgartner B, Muhar M, Roth M, et al. An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. Cell Rep 2013; 5(6):1704-13.
11. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. Pharmacogenomics 2009; 10(3):399-416.
12. Jeon YJ, Choi YS, Rah H, Kim SY, Choi DH, Cha SH, et al. Association study of microRNA polymorphisms with risk of idiopathic recurrent spontaneous abortion in Korean women. Gene 2012; 494(2):168-73.
13. Singh K, Nair RR, Khanna A. Functional SNP -1562C/T in the promoter region of MMP9 and recurrent early pregnancy loss. Reprod Biomed Online 2012; 24(1):61-5.
14. Amin-Beidokhti M, Mirfakhraie R, Zare-Karizi S, Karamoddin F. The role of parental microRNA alleles in recurrent pregnancy loss: an association study. Reprod Biomed Online 2017; 34(3):325-330.
15. Barchitta M, Maugeri A, Quattrocchi A, Agrifoglio O, Agodi A. The role of miRNAs as biomarkers for pregnancy outcomes: a comprehensive review. International Journal of Genomics 2017; 2017.
16. Li D, Li J. Association of miR-34a-3p/5p, miR-141-3p/5p, and miR-24 in Decidual Natural Killer Cells with Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. Med Sci Monit 2016; 22:922-929.
17. 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):259-265.
18. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation [published correction appears in Genome Res 1999; 9(2):210]. Genome Res 1998; 8(12):1229-1231.
19. 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):123-126.
20. Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. Nat Genet 2009; 41(5):609-13.
21. Hughes AE, Bradley DT, Campbell M, Lechner J, Dash DP, Simpson DA, et al. Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract. Am J Hum Genet 2011; 89(5):628-33.
22. de Pontual L, Yao E, Callier P, Faivre L, Drouin V, Cariou S, et al. Germline deletion of the miR-17~92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. Nat Genet 2011; 43(10):1026-30.
23. Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH. Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. Mol Reprod Dev 2003; 66(1):24-31.
24. Zhang C, Liu Y, Ring BZ, Nie K, Yang M, Wang M, et al. A novel multiplex tetra-primer ARMS-PCR for the simultaneous genotyping of six single nucleotide polymorphisms associated with female cancers. PLoS One 2013; 8(4):e62126.
25. Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(9):3300-3305.
26. Sun CM, Wu J, Zhang H, Shi G, Chen ZT. Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease. World J Gastroenterol 2017; 23(44):7888-7898.
27. Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q, Lv K. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. Int J Mol Med 2013; 31(4):797-802.
28. Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. J Hematol Oncol 2013; 6:6.
29. Jiao L, Zhang J, Dong Y, Duan B, Yu H, Sheng H, et al. Association between miR-125a rs12976445 and survival in breast cancer patients. Am J Transl Res 2014; 6(6):869-75.
30. Hu Y, Liu CM, Qi L, He TZ, Shi-Guo L, Hao CJ, et al. Two common SNPs in pri-miR-125a alter the mature miRNA expression and associate with recurrent pregnancy loss in a Han-Chinese population. RNA Biol 2011; 8(5):861-72.
31. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. Cold Spring Harb Perspect Biol 2018; 10(2):a028415.
32. Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Chemother Res Pract 2012; 2012:743193.
33. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res 2004; 14(10A):1902-1910.

34. El-Shorafa HM, Sharif FA. Dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss. Dysregulation of micro-RNA contributes to the risk of unexplained recurrent pregnancy loss 2016; 2(3).
35. Xu N, Zhang L, Meisgen F, Harada M, Heilborn J, Homey B, et al. MicroRNA-125b down-regulates matrix metallopeptidase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. J Biol Chem 2012; 287(35):29899-908.
36. Wang X, Li B, Wang J, Lei J, Liu C, Ma Y, et al. Evidence that miR-133a causes recurrent spontaneous abortion by reducing HLA-G expression. Reprod Biomed Online 2012; 25(4):415-24.
37. Ahn DH, Rah H, Choi YK, Jeon YJ, Min KT, Kwack K, et al. Association of the miR-146aC> G, miR-149T> C, miR-196a2T> C, and miR-499A> G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. Molecular carcinogenesis 2013; 52(S1):39-51.
38. Grossman H, Chuderland D, Ninio-Many L, Hasky N, Kaplan-Kraicer R, Shalgi R. A novel regulatory pathway in granulosa cells, the LH/human chorionic gonadotropin-microRNA-125a-3p-Fyn pathway, is required for ovulation. FASEB J 2015; 29(8):3206-3216.
39. Hu Y, Huo ZH, Liu CM, Liu SG, Zhang N, Yin KL, et al. Functional study of one nucleotide mutation in pri-miR-125a coding region which related to recurrent pregnancy loss. PLoS One 2014; 9(12):e114781.