مقاله پژوهشی

بررسی پلی‌مورفیسم ژن‌های VEGFA و MTHFD1 در سلول‌های خون زنان با سقط مکرر شهر تهران

سعید ذاکر بستان آباد[1*]، سهیلا درمانلو[2] و سمیه درمانلو[3]

۱- دانشگاه علمی و کاربردی موسسه فرزانگان اندیشمند مسعود (فام)، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم الانبیاء، تهران، ایران
۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: سعید ذاکر بستان آبادی، دکتری تخصصی، saeedzaker20@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۹/۱۱ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۱/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۴/۱

چکیده

مقدمه: سقط خود بخودی طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی ختم حاملگی یا تولد نوزاد کمتر از ۵۰۰ گرم قبل از هفته بیستم و دو حاملگی تعریف شده است. عوامل مختلفی می‌تواند موجب سقط مکرر گردد. از جمله علل ژنتیکی می‌توان به تاثیر برخی از پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی اشاره نمود. ژن فاکتور رشد اپیتالیوم عروقی (VEGF) از جمله ژن‌های کلیدی و مهم در رگ زایی است. متیلین تتراهیدروفولات دهیدروژناز سیکلوژناز و فورمیل تتراهیدرو فولات سنتتاز I (MTHFD1) در متابولیسم فولات نقش دارد. هدف از این تحقیق بررسی پلی مورفیسم ژن VEGFو MTHFD1 در ارتباط با سقط مکرر خود به خودی در زنان شهر تهران می‌باشد.

روش مطالعه: از ۵۰ زن مبتلا به بیماری سقط مکرر و ۱۰ زن سالم بدون سابقه سقط نمونه خون جمع آوری شد. DNA ژنومی از لوکوسیت‌های خون محیطی استخراج گردید. پلی‌مورفیسم ژنVEGF rs3025039 و MTHFD1 rs2236225 با PCR بررسی و به وسیله الکتروفورز ژل آگارز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیز آماری توسط نرم‌افزار FinchTV انجام شد.

نتایج: فراوانی ژنوتیپ‌های CC و CT برای جهش VEGFA rs2236225 به ترتیب در گروه بیمار ۸۶ % و ۱۴ % و در گروه کنترل پلی مورفیسم ۹۰ % و ۱۰ % بود. فراوانی ژنوتیپ‌هایGG و GA برای جهش MTHFD1 rs3025039 به ترتیب در گروه بیمار ۸۲ % و ۱۸ % بود و و در گروه کنترل پلی مورفیسم دیده نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که بین پلی‌مورفیسم VEGFA و MTHFD1 با سقط مکرر رابطه معنادار وجود دارد. مطالعه پلی‌مورفیسم ژن MTHFD1 در جمعیت‌ها می‌تواند به عنوان مارکر تشخیصی در استعداد ابتلا به سقط مکرر باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های خون، سقط خودبخودی، پلی‌مورفیسم، MTHFD1، VEGFA، PCR

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی سقط را از دست دادن جنین یا رویان تا وزن ۱۵۰ گرم، پیش از هفته ۲۲ بارداری تعریف می‌کند. سقط یک اتفاق متداول در طی دوران بارداری است و یکی از مشکلاتی است که همسران جوان با آن روبرو هستند، که باعث نگرانی و ناکامی آنها می‌شود. در واقع حدود ۱۵٪ بارداری‌هایی که از نظر کلینیکی تشخیص داده می‌شوند، در نیمه اول بارداری سقط می‌شوند (Wolman, 2014). سقط مکرر به دو گروه سقط مکرر اولیه و ثانویه تفکیک می‌گردد. در سقط اولیه فرزند زنده متولد نمی‌شود، ولی در سقط مکرر ثانویه یک یا چند تولد زنده و پس از آن سقط‌های پشت سر هم رخ می‌دهد. مطالعات انجام شده بیان می‌کند که سه سقط پشت سر هم ریسک Recurrent pregnancy loss (RPL) خود به خودی را در حاملگی‌های بعدی ۸۴-۷۳٪ افزایش می‌دهد. به طور کلی در زنانی که حاملگی اول آن‌ها

موفقیت‌آمیز بوده است، ریسک سقط بعدی به طور نسبی پایین و حدود ۶-۴٪ است. اما در زنانی که حاملگی آخر آن‌ها سقط شده است احتمال سقط بعدی بیشتر و حدود ۲۴-۱۹٪ است. در کل ریسک سقط بعد از ۴ سقط گذشته کمتر از ۴۰٪ بوده و این ریسک حتی در افرادی با سابقه ۶ سقط یا بیشتر نیز بیشتر از ۵۰٪ نمی‌باشد. همچنین این ریسک با افزایش سن بیشتر می‌شود، به طوری که در سنین زیر ۳۰ سال ۱۵-۷٪، ۳۰ تا ۴۰ سال، ۲۱-۸٪ سنین ۳۵ تا ۳۹ سال ۲۸-۱۷٪ و بعد از چهل سالگی حدود ۵۲-۳۴٪ می‌باشد (Ford and Schust, 2009). منظور از سقط مکرر خود به خودی دفع محصولات حاملگی قبل از هفته ۲۲ بارداری است.لازم به ذکر است که اگرچه رخداد سقط خود می‌تواندیک پدیده مفید در جلوگیری از تولد نوزادان ناهنجار و مشکلات دیگر باشد و بالقوه مفید باشد، اما اگر بیش از دو یا سه بار متوالی تکرار گردد جنبه پاتولوژیک پیدا نموده و تحت عنوان سقط مکرر خود به خودی (RPL) نامیده می‌شود و نیازمند بررسی و درمان مناسب خواهد بود. سقط مکرر خود به خودی حدود ۳٪ از زنان حامله را به خود اختصاص می‌دهد. بررسی علت سقط مکرر خود به خودی را بعد از سه بار سقط آغاز می‌کنند. ولی در برخی شرایط مثل بیماری‌های زمینه‌ای و عفونت‌های مزمن، سن بالای مادر و وزن بالا بعد از دو بار سقط اقدامات تشخیصی را باید آغاز کرد (Robinson, 2014). اختلال در جریان خون رحمی با عوارض پریناتال و مرگ و میر ناشی از زایمان زودرس، پره اکلامپسی و یا محدودیت رشد داخل رحم در ارتباط است. ژن VEGF فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor) است و کد کننده هپارین و به صورت همودایمر است و وزنی معادل ۴۵ کیلودالتون دارد. این ژن در متاستاز، آنژیوژنز یا رگ‌زایی و در رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی نقش دارد. بیان بیش از حد ژن VEGF در نقاط شروع رونویسی است جایگاه این ژن در انسان برروی کروموزوم شماره ۶ بازوی بلند ناحیه ۲ باند ۱ و ساب بند ۱ است q21.1۶ و شامل ۹ اگزون می‌باشد (Vural *et al.*, 2009). از آنجا که بیان ژن VEGF در تشکیل عروق خونی نقش مهمی دارد می‌تواند در تشکیل جفت و رساندن مواد مغذی از مادر به جنین موثر باشد و در صورت عدم وجود این عامل رشد در تشکیل عروق جفت اختلال ایجاد می‌شود و موجب نارسایی جفت و در نهایت اختلال در انتقال مواد مغذی از مادر به جنین می‌شود و سقط جنین را به دنبال خواهد داشت (Robinson, 2014). VEGF یکی از اولین فاکتورهای رگ‌زایی است که شناسایی شده است. اعتقاد بر این است کهVEGF Aمهمترین تنظیم‌کننده رگ‌زایی نرمال و پاتولوژیک می‌باشد. میزان VEGF به سایر عوامل درگیر در روند لخته‌سازی وابسته است. جهش در افرادی با شرایط رژیم غذایی غنی از فیبر و فاقد چربی، ورزش‌های روزانه، عدم استفاده از دخانیات و سایر عوامل ناشناخته ی دیگر عارضه‌ای قابل تحمل است، درحالیکه در افراد فاقد شرایط مذکور وقوع این جهش می‌تواند منجر به بروز فنوتیپ‌های بالینی یا بیوشیمیایی گردد. بدین ترتیب اختلاف در عوامل محیطی می‌تواند اختلاف در اثر چندشکلی‌های VEGF بر سقط مکرر جنین در جوامع مختلف را توجیه کند. همه انواع این ژن گیرنده تیروزین کینازی دارند و تنظیم‌کننده تکثیر سلول آندوتلیال مهاجرت و تمایز است و نقش مهمی در آنژیوژنز جنین و جفت دارد و توسط سلول‌های آندومتر و جفت ترشح می‌شود. VEGF در سطح بالایی در جفت انسانی بیان می‌شود و در زنان با سابقه سقط مکرر در سطح پایین بیان می‌شود. شکل‌گیری جنین یک رویداد چند فاکتوری است که به تعامل بلاستوسیست با آندومتری receptive بستگی دارد و از سیگنالینگ مولکولی توسط جنین تشکیل شده است و پس از اعمال و وابستگی به اندومتر پس از تشکیل مرحله دوم شامل حمله جنین به اندومترمی‌شود. این تهاجم باعث ایجاد آنژیوژنز آندومتر می‌شود که توسط عوامل رشد متعدد، از جمله فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) گسترش می‌یابد. VEGF باعث افزایش نفوذپذیری عروق و فعال شدن سلول اندوتلیال تکثیر، مهاجرت، تمایز و شکل گیری مویرگی می‌شود. VEGF همچنین یک تنظیم‌کننده کلیدی در آنژیوژنز اندومتری است (Ferrara *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2013).

متیلین تتراهیدروفولات دهیدروژناز سیکلوژناز و فورمیل تتراهیدرو فولات سنتتاز I (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase and formyltetrahydrofolate synthetase 1) به اختصار MTHFD1 یک آنزیم سه کاره محسوب می‌شود که در سنتز DNA و متابولیسم فولات نقش دارد و سه واکنش متفاوت از مسیر فولات را کاتالیز می‌کند. متابولسیم اسید فولیک شامل مسیرهای متعددی است که منجر به تشکیل نوکلئوتید و متابولیسم DNA می‌شود. به طور خاص سرین هیدروکسی متیل ترانسفراز (SHMT) در سیتوپلاسم می‌تواند واحدهای یک کربن از سرین به تتراهیدرو فولات (THF) را برای تشکیل گلیسین و ۱۰ و ۵_ THF Methylene کاتالیز کند. مسیر متابولیک فولات شامل یک شبکه پیچیده از آنزیم‌ها از جمله MTHFD1، MTHFD1L و MTHFD2 است. اگر این آنزیم‌ها مهار شود سلول می‌تواند با استفاده از MTHFD1 سیتوپلاسمی جبران شود. MTHFD1 نقش کلیدی در سنتز نوکلئوتید دارد (He *et al.*, 2018). ژن MTHFD1 بر روی کروموزوم شماره ۱۴ (14 q23.3) قرار دارد و طول این ژن برابر با ۷۱ کیلودالتون است و دارای ۲۸ اگزون می‌باشد و با اختلالات سنتزDNA و تقسیم سلولی در رشد و همچنین آنکوژنز مرتبط است (Murthy *et al.*, 2014).

در این پژوهش به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم دو ژن VEGFA و MTHFD1 با ایجاد سقط مکرر پرداخته شد. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند به عنوان یک راهکار مولکولی جدید در تشخیص و درمان کمک شایان انجام دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: نمونه سلول‌های خونی از ۶۰ خانم مراجعه کننده به آزمایشگاه مسعود واقع در شهر تهران تهیه شد. گروه بیمار شامل خون ۵۰ بیمار خانم زیر ۳۵ ساله که دارای سابقه حداقل دو سقط جنین مکرر بی دلیل بودند بود و گروه کنترل شامل ۱۰ خانم سالم زیر ۳۵ سال، که حداقل ۲ زایمان موفق داشته‌اند و سابقه ی سقط جنین نداشته‌اند بود. از افراد مورد مطالعه در ابتدا رضایت کتبی به منظور خونگیری وریدی و تکمیل پرسشنامه گرفته شد. سپس ۵ سی سی خون از هر نمونه در لوله آزمایش که حاوی ماده ی ضد انعقاد EDTA بود نمونه‌گیری شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

مراحل استخراج: استخراج DNA ژنومی توسط کیت DNG-PLUS صورت گرفت. نمونه‌های خون با GPP– solution مخلوط شدند و در بن ماری با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس زیر هود، NaCl و کلروفرم به محلول اضافه شده و در داخل دستگاه سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰rpm و به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. بعد از پایان سانتریفوژ ۳ فاز ایجاد شد، فاز بالایی آبی را برداشته در میکروتیوپ ریخته شد و در دو مرحله پیاپی به آن الکل ۷۰ و ۱۰۰ درصد اضافه شد و هر بار با دور ۶۰۰۰rpm و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی را دور ریخته و میکروتیوپ به مدت ۱۰ دقیقه به صورت واژگون در دمای محیط قرار داده شد. سپس به میکروتیوپ، آب مقطر استریل افزوده شد تا DNA با آب مخلوط شود. پس از آن DNA به یخچال منتقل شد. برای بررسی پلی مورفیسم مورد نظر، DNA ژنومی به‌روش PCR تکثیر شد.

طراحی پرایمر: پرایمرهای مربوط به ژن برای VEGFA و MTHFD1 با نرم افزار Oligo نسخه ۷/۵۶ و بسایت NCBI طراحی گردید (جدول ۱) و از نظر اختصاصیت و ایجاد ساختارهای ثانویه بوسیله نرم افزار های Oligo analyzer 3.0 و Primer Blast NCBI ارزیابی و جهت سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شد.

فرآیند تکثیر PCR: واکنش Real time برای ژن‌های هدف و مرجع در افراد بیمار و نرمال درپلیت‌های ۹۶ چاهک بدین صورت انجام پذیرفت. مقادیر ۱۲/۵ میکرولیتر از X Master Mix ساخت شرکت Fermentase، ۱ میکرولیتر از پرایمر Forward و ۱ میکرولیتر از پرایمر Reverse، ۱/۵ میکرولیتر از cDNA با غلظت ۲ نانوگرم در میکرولیتر و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر به ترتیب اضافه گردید. سپس برنامه اجرایی PCR طبق جدول ۲ و ۳ به ترتیب برای ژن‌های VEGFA و MTHFD1 انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده

ژن هدف	توالی (5'→ 3')	T_m	انداز ژن (bp)
VEGFA	**F:** AAGGAAGAGGAGACTCTGCGC **R:** TATGTGGGTGGGTGTGTCTACA	۶۰	۱۹۸
MTHFD1	**F:** TTCTTCCTTTGATTCCAAATCAA **R:** AGCAACAGTAAAAATGCCATCC	۵۶/۵	۲۳۲

جدول ۲- برنامه اجرایی PCR برای VEGFA

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه (Initial Denaturation)	۹۴	۸ دقیقه	۴۰ سیکل
واسرشت (Denaturation)	۹۴	۴۵ثانیه	
اتصال پرایمرها (Annealing)	۶۰	۶۰ ثانیه	
سنتز (Extension)	۷۲	۶۰ ثانیه	
سنتز نهایی (Final Extension)	۷۲	۸ دقیقه	

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار FinchTV و آزمون مربع کای (Chi-squared) مورد بررسی قرار گرفتند. سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

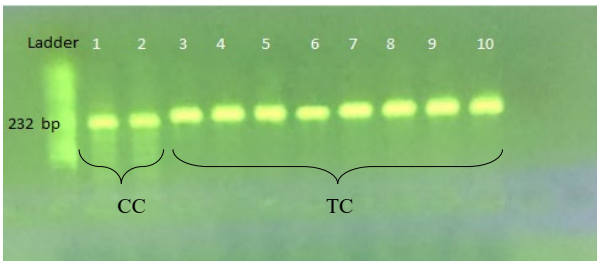
بر طبق مقالات تعدادی از پلی مورفیسم‌های ژن VEGFA عبارتند از: +936C > T (rs3025039), −634G > C (rs2010963), −2578C > A (rs699947), and + 1612G > A (rs10434 (Kim *et al.*, 2019). همچنین تعدادی از پلی مورفیسم‌های ژن MTHFD1 عبارتند از: G>A(rs2236225), T/C 1958, - -105C>T (rs1076991), G/A (rs2235224) (rs8016556) ,1474G>T (rs1256142) 1470G>A (rs8010584), G/A/C A>T(rs746488) 473 (rs4243628), A/G (rs2236222) ,G/A (rs11629135) (Wang *et al.*, 2016). باتوجه به

مطالعات قبل دو پلی‌مورفیسم VEGFA rs3025039 و MTHFD1 rs2236225 برای ادامه مطالعه انتخاب شدند.

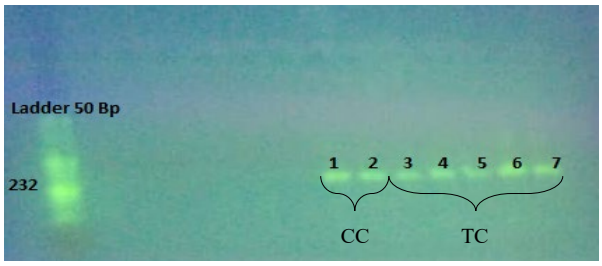
جدول ۳- برنامه اجرایی PCR برای MTHFD1

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه (Initial Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه	۳۵ سیکل
واسرشت (Denaturation)	۹۴	۴۰ ثانیه	
اتصال پرایمرها (Annealing)	۵۶/۵	۶۰ ثانیه	
سنتز (Extension)	۷۲	۴۰ ثانیه	
سنتز نهایی (Final Extension)	۷۲	۸ دقیقه	

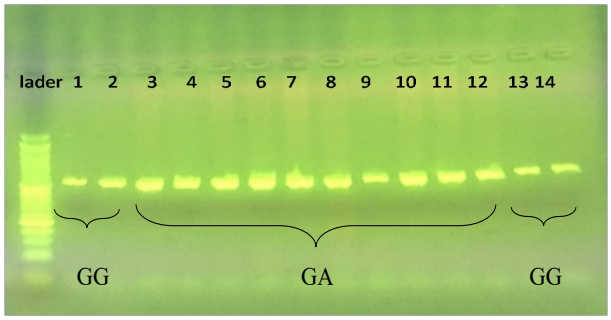
شکل‌های ۱ و ۲ نتایج ژل الکتروفورز ژن VEGF A برای گروه کنترل (زنان با حداقل دو زایمان موفق) و گروه کنترل (زنان دارای سابقه سقط مکرر) را نشان می‌دهد. شکل‌های ۳ و ۴ نتایج ژل الکتروفورز ژن MTHFD1 برای گروه کنترل (زنان با حداقل دو زایمان موفق) و گروه کنترل (زنان دارای سابقه سقط مکرر) را نشان می‌دهد.



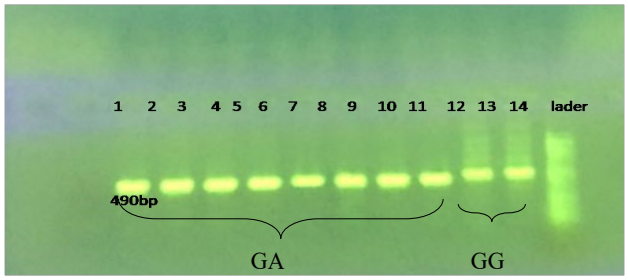
شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات VEGFA rs3025039 گروه کنترل



شکل ۲- ژل الکتروفورز محصولات VEGFA rs3025039 گروه مورد بیمار



شکل ۳- ژل الکتروفورز محصولات ژن MTHFD1 rs2236225 گروه کنترل



شکل ٤- ژل الکتروفورز محصولات MTHFD1 rs2236225 گروه بیمار

جدول ۴ فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم VEGFA rs3025039 و جدول ۵ فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم MTHFD1 rs2236225 و ارتباط انها با سقط مکرر را نشان می‌دهد.

جدول ٤- فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم VEGFA rs3025039

نمونه	نحوه شمارش	CC	CT	جمع
بیمار	درصد در نمونه	۸۶	۱۴	۵۰
	درصد در نمونه	٪۸۶	٪۱۴	
کنترل	درصد در نمونه	۹	۱	۱۰
	درصد در نمونه	٪۹۰	٪۱۰	

در مطالعه حاضر نمونه‌های سلول خون ۵۰ زن بیمار دارای سقط مکرر خود به خودی و ۱۰ زن سالم با بارداری موفق بدون سقط جنین از نظر پلی مورفیسم MTHFD1 rs2236225 و VEGFA rs3025039 مورد بررسی قرار گرفت. که از بین زنان بیمار ۴۳ نفر (٪۸۶) دارای پلی مورفیسم rs3025039 CC و ۷ نفر (٪۱۴) دارای پلی مورفیسم rs3025039 CT بودند. در ژن MTHFD1 از بین

افراد بیمار ۹ نفر (۱۸٪) دارای پلی مورفیسم rs2236225 GG و ۴۱ نفر (۸۲٪) دارای پلی‌مورفیسم rs2236225 GA بودند.

جدول ۵- فراوانی ژنوتیپی پلی مورفیسم MTHFD1 rs2236225

جمع	GA	GG	نحوه شمارش	نمونه
۵۰	۱۸	۸۲	درصد در نمونه	بیمار
	٪۱۸	٪۸۲	درصد در نمونه	
۱۰	۰	۱۰	درصد در نمونه	کنترل
	٪۰	٪۱۰۰	درصد در نمونه	

بحث

پلی مورفیسم به معنی واریانس طبیعی در یک لوکوس خاص از ژنوم می‌باشد. پلی‌مورفیسم به دلیل جهش در یک لوکوس به دنبال نیروهای تکاملی از قبیل انتخاب طبیعی یا رانش ژن ایجاد شده و به این ترتیب نسل‌های بعدی آن جمعیت، دارای این پلی‌مورفیسم در ژنوم خود می‌باشند (Casillas and Barbadilla, 2017). اگر توالی ناحیه دقیقا یکسانی از DNA در محل خاصی روی یک کروموزوم در افراد مختلف گوشه و کنار جهان تعیین شود و با هم مقایسه گردد، تشابه بسیار زیادی بین آن‌ها مشاهده می‌شود. در واقع، هر قطعه از DNA انسان به طول تقریبا ۱۰۰۰ جفت باز، به طور متوسط حاوی فقط یک جفت باز متفاوت بین دو فرد در آن جمعیت است. وقتی آلل‌ها به حدی فراوان باشند که در بیش از ۱٪ کروموزوم‌ها در جمعیت عمومی یافت شوند، آنچه را که پلی مورفیسم نام دارد تشکیل می‌دهند. در مقابل آلل‌هایی با کمتر از ۱٪ را، طبق قرارداد، انواع نادر می‌نامند. برخی آلل‌ها، که نمایانگر تغییری در توالی DNA واقع بین ژن‌ها یا در داخل اینترون‌ها می‌باشند، معمولا تاثیری بر عملکرد ژنی ندارند و با تجزیه و تحلیل مستقیم DNA قابل شناسایی هستند. تغییرات دیگر در توالی رمزدار خود ژن‌ها قرار دارند و ممکن است به ایجاد انواع مختلفی از پروتئین منجر گردند که به نوبه خود امکان دارد موجب فنوتیپ‌های کاملا متمایز شوند. بسیاری از جهش‌ها بی خطر و بسیاری دیگر نیز طی چند نسل برای همیشه حذف می‌شوند (Strachan *et al.*, 2014).

در این پژوهش فراوانی جهش C936T در ژن VEGFA و فراوانی جهش G1958A در ژن MTHFD1 بین ۵۰ گروه بیمار و ۱۰ گروه کنترل مطالعه انجام پذیرفت. ژن VEGF فاکتور رشد آندوتلیال عروقی است و کد کننده هپارین می‌باشد و هموداینمر است. وزنی معادل ۴۵ کیلو دالتون دارد. این ژن در متاستاز و آنژیوژنز یا رگ‌زایی و در رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی نقش دارد. بیان بیش از حد ژن VEGF در نقاط شروع رونویسی است. جایگاه این ژن در انسان برروی کروموزوم شماره ۶ بازوی بلند ناحیه ۲ باند ۱ و ساب بند ۱ است و شامل ۹ اگزون است (Kim *et al.*, 2019). VEGFیکی از اولین فاکتورهای رگ‌زایی است که شناسایی شده است. اعتقاد براین است که VEGFA مهمترین تنظیم کننده رگ‌زایی نرمال و پاتولوژیک می‌باشد. MTHFD1 نقش کلیدی در سنتز نوکلئوتید دارد و پلی مورفیسم‌های این ژن با ایجاد اختلال در سنتز DNA و تقسیم سلولی در رشد و همچنین آنکوژنز مرتبط است. ژن MTHFD1 بر روی کروموزوم شماره ۱۴ قرار دارد. q23.3 ۱۴و طول این ژن برابر با ۷۱ کیلودالتون است و دارای ۲۸ اگزون می‌باشد (He *et al.*, 2018).

Samli و همکارانش در سال ۲۰۱۲ ارتباط پلی مورفیسم ژن VEGF را در سقط مکرر بررسی کردند در این مطالعه از ۳۸ زن مبتلا به سقط مکرر و ۳۰ زن به عنوان شاهد یا کنترل از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۱ در منطقه بوریا در ترکیه نمونه‌گیری شد. پلی‌مورفیسم ژن VEGF با استفاده از تکنیک PCR بررسی شد و یکی از پلی مورفیسم‌ها (1154 G/A) بیشترین ارتباط را با سقط مکرر در زنان ترکیه نشان داد (Şamlı *et al.*, 2012). Papazoglou و همکارانش ارتباط پلی مورفیسم‌های ژن VEGF شامل -2578C/A, -634G/C, -1154G/A, 936C/T را بر سقط مکرر در ۵۲ بیمار مبتلا به سقط مکرر و ۸۲ مورد از زنان به عنوان کنترل یا شاهد بررسی کردند و نتیجه گرفتند اختلاف معنی‌داری در ژنوتیپ -1154G/A و فراوانی آلل بین زنان با از دست رفتن حاملگی و کنترل وجود دارد. خطر حاملگی مکرر در حاملان آلل G کمتر از زنان با آلل A بود. همچنین هیچ ارتباط معنی‌داری بین سقط مکرر خودبخودی و ژنوتیپ‌های دیگر وجود نداشت (Papazoglou *et al.*, 2005). Ghasemi و همکارانش به بررسی ارتباط ژن VEGF و پلی مورفیسم -460 C/T و +405 G/C و سندرم OHSS (ovarian hyperstimulation syndrome) مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه مقطعی، پلی‌مورفیسم ژن VEGF در ۷۵ زن مبتلا به OHSS (گروه بیمار) و ۸۵ زن سالم (گروه کنترل) مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری در فراوانی پلی مورفیسم -460 C/T بین گروه کنترل و بیمار وجود نداشت. فراوانی پلی مورفیسم +405 G/C در زنان بیمار بالاتر بود. بنابراین در زنان مبتلا به OHSS، پلی مورفیسم ژن +405 G/C می‌تواند موثر باشد (Ghasemi *et al.*, 2017). Eller و همکارانش در سال ۲۰۱۱ ارتباط ژن VEGF با سقط مکرر را بررسی کردند. در این مطالعه ۹۹ زن با سابقه سقط مکرر و ۱۸۱ زن با سابقه باروری موفق مورد مطالعه قرار گرفتند. چهار پلی‌مورفیسم −634 G/C, −1154 G/A, −2578 C/A و +936 C/T در ژن VEGFA مورد بررسی قرار گرفتند. فراوانی آلل −2578 A در زنان مبتلا به سقط مکرر نسبت به گروه کنترل پایین‌تر بود (Eller *et al.*,

Aggarwal (2011). و همکارانش در سال ۲۰۱۱ ارتباط چهار پلی‌مورفیسم (−2578C/A, −2549 18-bp I/D, −1154G/A و +936C/T) ژن VEGF با سقط مکرر در زنان شمال هند را بررسی کردند. در این مطالعه ۲۰۰ زن به عنوان گروه کنترل و ۲۰۰ زن به عنوان گروه بیمار مورد مطالعه قرار گرفتند. آنها نتیجه گرفتند دو پلی‌مورفیسم رایج −1154G/A و +936C/T موجب افزایش خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان شمال هند می‌شود (Aggarwal *et al.*, 2011). Sutherland و همکارانش در سال ۲۰۱۴ ارتباط دو پلی‌مورفیسم (R 134K و R 653Q) در ژن MTHFD1 با میگرن را در ۵۲۰ بیمار و ۵۲۰ گروه کنترل بررسی کردند. نتایج آنها حاکی از عدم ارتباط بین این دو پلی‌مورفیسم و میگرن بود (Sutherland *et al.*, 2014). Zheng و همکارانش در سال ۲۰۱۵ ارتباط پلی مورفیسم G1958A از ژن MTHFD1 را با neural tube defects (NTD) بررسی نمودند. نتایج آنها حاکی از عدم ارتباط معنادار بین پلی مورفیسم G1958A از ژن MTHFD1 با NTD بود (Zheng *et al.*, 2015). Donglin و همکارانش در سال ۲۰۱۴ ارتباط خطر ابتلا به NTD را با اسیدفولیک اسید پیروویک در متابولیسم فولات بررسی کردند و نتیجه گرفتند ژن MTHFD1 نقش مهمی در متابولیسم فولات دارد و با خطر ابتلا به NTD در ارتباط است (He *et al.*, 2018).

ارتباط پلی‌مورفیسم ژنتیکی با سقط مکرر خود به خودی هنوز به طور کامل مشخص نیست و مطالعات بیشتری در این رابطه نیاز است. از آنجا که به نظر می‌رسد سقط مکرر یک بیماری نباشد بهتر است آن را یک سندروم در نظر گرفت. عوامل مختلفی می‌تواند در سقط مکرر نقش داشته باشد و احتمالا پلی‌مورفیسم های ژن‌های مختلف با آن در ارتباط است. با توجه به نتایج این مطالعه پلی مورفیسم هر دو ژن rs 2236225 در ژن MTHFD1 و rs 3025039 در ژن VEGFA ارتباط معناداری با سقط مکرر دارد. اما در رابطه با مطالعات پلی‌مورفیسم ژن‌ها و RPL پیچیدگی مطالعات، عدم امکان تکرار و مقایسه دقیق در نتیجه‌گیری صد درصدی تاثیرگذار است. در جوامع مختلف، تعداد افراد مورد مطالعه، ترکیب، پراکنش جغرافیایی و قومیت جمعیت مورد مطالعه در صحت نتایج مهم هستند. در واقع مطالعات بیشتری با جمعیت‌های آماری بیشتر بر روی قومیت‌ها و ملیت‌های مختلف برای مشخص کردن وجود ارتباط پلی مرفیسم‌های VEGFA و سقط مکرر جنین مورد نیاز است. همچنین مطالعات بیشتری برای مشخص کردن ارتباط بالقوه بین پلی مورفیسم‌های مختلف VEGFA و هاپلوتایپ‌ها مورد نیاز است. علاوه بر این، مطالعات بر روی بیان ژن نیز می‌توانند در مشخص کردن نقش پلی‌مورفیسم‌ها در اتیولوژی سقط مکرر کمک کننده باشند (Kamali *et al.*, 2018). در ارتباط پلی‌مورفیسم G1958A با سقط مکرر جنین نقش این پلی‌مورفیسم احتمالا به وسیله جذب فولات در رژیم غذایی و عوامل جغرافیایی و نژادی تحت تاثیر قرار گرفته و فنوتیپ نهایی حاصل بر هم‌کنش این عوامل می‌باشد. در واقع اثر SNP بر فعالیت آنزیم MTHFD1 به وضعیت فولات وابسته است و جهش احتمالا در افرادی که غنی از فولات هستند تحمل شده، ولی در افرادی که جذب فولات اندک می‌باشد، وقوع این جهش می‌تواند منجر به بروز فنوتیپ‌های بالینی یا بیوشیمیایی شود. بدین ترتیب، اختلاف در اثر پلی مورفیسم‌های MTHFD1 بر سقط مکرر جنین در جوامع مختلف را توجیه می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که در رژیم غذایی هندی‌ها و جوامع آفریقایی در مقایسه با جوامع غربی و اروپایی، میزان فولات کم‌تر است و این جوامع را با مشکلاتی از قبیل نقایص لوله عصبی در دوران تکوین جنین، انباشته شدن هموسیستئین و نقص در سنتز و ترمیم DNA، بسیار مستعد می‌کند. البته این مشکلات را می‌توان با استفاده از مکمل اسید فولیک برای خانم‌ها برطرف نمود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش فراوانی جهش C936T در ژن VEGFA و فراوانی جهش G1958A در ژن MTHFD1 بین ۵۰ گروه بیمار و ۱۰ گروه کنترل مطالعه انجام پذیرفت. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، پلی‌مورفیسم rs 2236225 در ژن MTHFD1 و rs 3025039 در ژن VEGFA ارتباط معناداری با سقط مکرر دارد. همچنین مطالعه پلی‌مورفیسم ژن MTHFD1 در جمعیت‌ها می‌تواند به عنوان مارکر تشخیصی در استعداد ابتلا به سقط مکرر باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از کارکنان و مدیریت آزمایشگاه مسعود که انجام این پژوهش را میسر نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

مراجع

Aggarwal, S., Parveen, F., Faridi, R.M., Phadke, S., Borkar, M. and Agrawal, S. 2011. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in north indian patients with recurrent miscarriages. Reproductive biomedicine online, 22(1): 59-64.

Casillas, S. and Barbadilla, A. 2017. Molecular population genetics. Genetics, 205(3): 1003-1035.

Eller, A.G., Branch, D.W., Nelson, L., Porter, T.F. and Silver, R.M. 2011. Vascular endothelial growth factor-a gene polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss . Journal of reproductive immunology, 88(1): 48-52.

Ferrara, N., Gerber, H.-P. and LeCouter, J. 2003. The biology of vegf and its receptors. Nature medicine, 9(6): 669-676.

Ford, H.B. and Schust, D.J. 2009. Recurrent pregnancy loss: Etiology, diagnosis, and therapy. Reviews in obstetrics and gynecology, 2(2): 76.

Ghasemi, N., Dehghani Firouzabadi, R. and Ahmadi, S. 2017. Association of -460c/t and +405 g/c polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene and susceptibility of ovarian hyperstimulation syndrome. International Journal of Reproductive BioMedicine, 15(2): 87-92.

He, D., Yu, Z., Liu, S., Dai, H., Xu, Q. and Li, F. 2018. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1 (mthfd1) is underexpressed in clear cell renal cell carcinoma tissue and transfection and overexpression in caki-1 cells inhibits cell proliferation and increases apoptosis. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 24: 8391.

Kamali, M., Hantoushzadeh, S., Borna, S., Neamatzadeh, H., Mazaheri, M., Noori-Shadkam, M. and Haghighi, F. 2018. Association between thrombophilic genes polymorphisms and recurrent pregnancy loss susceptibility in the iranian population: A systematic review and meta-analysis. Iranian biomedical journal, 22(2): 78.

Kim, Y.-J., Chul, W., Jun, K.-H. and Chin, H.-M. 2019. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor (vegf) associated with gastric cancer recurrence after curative resection with adjuvant chemotherapy. BMC cancer, 19(1): 483.

Li, L., Donghong, L., Shuguang, W., Hongbo, Z., Jing, Z. and Shengbin, L. 2013. Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene associated with recurrent spontaneous miscarriage. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine, 26(7): 686-690.

Murthy, J., Gurramkonda, V.B. and Lakkakula, B.V. 2014. Significant association of mthfd1 1958g> a single nucleotide polymorphism with nonsyndromic cleft lip and palate in indian population. Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal, 19(6): e616.

Papazoglou, D., Galazios, G., Papatheodorou, K., Liberis, V., Papanas, N., Maltezos, E. and Maroulis, G.B. 2005. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. Fertility and sterility, 83(4): 959-963.

Robinson, G.E. 2014. Pregnancy loss. Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology, 28(1): 169-178.

Şamlı, H., Demir, B., Özgöz, A., Atalay ,M. and Uncu, G. 2012. Vascular endothelial growth factor gene 1154 g/a, 2578 c/a, 460 c/t, 936 c/t polymorphisms and association with recurrent pregnancy losses. Genet. Mol. Res., 11(4): 4739-4745.

Strachan, T., Goodship, J. and Chinnery, P. 2014. Genetics and genomics in medicine. Taylor & Francis.

Sutherland, H.G., Hermile, H., Sanche, R., Menon, S., Lea, R.A., Haupt, L.M. and Griffiths, L.R. 2014. Association study of mthfd 1 coding polymorphisms r 134 k and r 653 q with migraine susceptibility. Headache: The Journal of Head and Face Pain, 54(9): 1506-1514.

Vural, P., Küskü-Kiraz, Z., Doğru-Abbasoğlu, S., Çil, E., Karadağ, B., Akgül, C. and Uysal, M. 2009. Vascular endothelial growth factor− 2578 a/c,− 460 t/c and+ 405 g/c polymorphisms in polycystic ovary syndrome. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 147(1): 57-60.

Wang, W., Jiao, X.-H., Wang, X.-P., Sun, X.-Y. and Dong, C. 2016. Mtr, mtrr, and mthfr gene polymorphisms and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 20(6): 297-303.

Wolman, I. 2014. Berek and novak's gynecology 15th edition. Springer.

Zheng, J., Lu, X., Liu, H., Zhao, P., Li, K. and Li, L. 2015. Mthfd1 polymorphism as maternal risk for neural tube defects: A meta-analysis. Neurological Sciences, 36(4): 607-616.

Research in Karyotic Cell &Tissue, Volume 1, Issue 1, 2020, Pages 9-15

Research Article

Evaluation of VEGFA and MTHFD1 Polymorphism in the Blood Cells of Iranian women with Recurrent miscarriage

Saeed Zaker Bostanabad [1,*], Soheila Darmanlo[2], and Somayeh Darmanloo[3]

[1] Scientific-Applied Training Center of Farzanegan Andishmand Massoud (FAM), Tehran, Iran
[2] Shafa nevroscience research center, khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[3] Department of Biology, Islamic Azad University, Parand Branch, Tehran, Iran

*Corresponding author: Saeed Zaker Bostanabad, Ph.D. saeedzaker20@yahoo.com

Received 2nd December 2019 Revised 18th April 2020 Accepted 21st June 2020

Abstract

Introduction and Aim: According to the WHO definition, recurrent miscarriage is a consecutive pregnancy loss before weeks 22. Different factors involved in recurrent abortion as a multifactorial disease. Genetic factors are one of the important factors associated with recurrent abortion. VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) is one of the important gene in angiogenesis. MTHFD1 (Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase, Cyclohydrolase, And Formyltetrahydrofolate Synthetase 1) is a protein-coding gene that metabolism folate. The goal of this article is to assess the association between single nucleotide polymorphisms of VEGFA and MTHFD1 and the recurrent miscarriage in Iranian women.

Material and method: The study group was 50 women with recurrent miscarriages and the control groups consisted of 10 women with at least two successful pregnancies and no miscarriages. The DNA extracted from leucocytes cells. PCR was used to find the association between VEGFA and MTHFD1 genes and recurrent miscarriages. Analyzing performed with FinchTV software after data sequencing.

Result: Our results showed that the polymorphism frequency of CC and CT in rs2236225 VEGFA were 86% and 14% in women with recurrent miscarriages and 90% and 10% in the control group. the polymorphism frequency of GG and GA in rs3025039MTHFD1 were 82% and 18% in women with recurrent miscarriages and no polymorphism was detected in the control group.

Conclusion: These results showed that there is an association between single nucleotide polymorphisms of VEGFA and MTHFD1 and the recurrent miscarriage in Iranian women. Furthermore, MTHFD1 polymorphism could be a molecular marker in the diagnosis of recurrent miscarriage.

Keywords: Blood Cells, Spontaneous abortion, Polymorphism, MTHFD1, VEGFA, PCR