

## بررسی ارتباط میان چندشکلی VNTR از اینترون چهارم و چندشکلی T:G اگزون هفتم از ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و سقط مکرر در

### زنان مبتلا مراجعه کننده به مرکز درمانی رویان

فاطمه عباسی کاکرودی<sup>۱</sup>، دکتر محمدحسین صنعتی<sup>۲\*</sup>، رقیه حبیبی<sup>۳</sup>، دکتر نادر چاپارزاده<sup>۴</sup>،  
دکتر حمید گورابی<sup>۵</sup>

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار زیست شناسی سلولی مولکولی دانشگاه تربیت معلم آذربایجان

۲- دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی  
۳- به ترتیب کارشناس ارشد و دانشیار پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mhsanati@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۱۳/۴/۸۹ - تاریخ پذیرش: ۵/۷/۹۰)

#### چکیده

مطالعات اخیر نشان داده که چند شکلی های ژنی در برخی از ژن ها می تواند از دلایل سقط مکرر باشد. از طرف دیگر، نیتریک اکساید به عنوان یک مولکول مهم در مسیر پیام رسانی سلول، در مراحل اولیه حاملگی شامل لانه گزینی بلاستوسیت، تمایز تروفوبلاست و تهاجم تروفوبلاستی دخیل است و سبب گردش خون جفتی-جنینی می شود. بنابراین در لانه گزینی و حفظ حاملگی نقش دارد. نیتریک اکساید به وسیله آنزیم نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در جفت بیان می شود، از آنجائی که این آنزیم و محصول آن در مراحل اولیه حاملگی نقش کلیدی ایفا می کند ارتباط میان چندشکلی این ژن و یکی از مشکلات حاملگی مثل سقط مکرر در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از ۱۰۰ زن مبتلا به سقط مکرر که دلیل خاصی برای سقط آن ها وجود نداشت و حداقل سه سقط مکرر داشتند به عنوان گروه بیمار استفاده شد. گروه کنترل نیز شامل ۱۰۰ زن با سابقه حاملگی طبیعی بود. هر دو گروه به منظور تشخیص چندشکلی VNTR در اینترون چهارم از ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی با استفاده از تکنیک PCR بررسی شدند و همچنین برای تشخیص چندشکلی Glu298Asp در اگزون هفتم این ژن از روش PCR-RFLP و تعیین توالی استفاده شد. بررسی ها نشان داد که فراوانی ژنوتیپی چند شکلی VNTR، در گروه بیمار ۶۳ درصد (bb)، ۳۳ درصد (ab)، ۴ درصد (aa) و گروه کنترل ۷۹ درصد (bb)، ۱۸ درصد (ab)، ۳ درصد (aa) می باشد. همچنین فراوانی ژنوتیپی مربوط به چندشکلی Glu298Asp در گروه بیمار ۷۱ درصد (GG)، ۲۵ درصد (GT)، ۴ درصد (TT) در گروه کنترل ۶۸ درصد (GG)، ۲۹ درصد (GT)، ۳ درصد (TT) بود. مطالعات آماری بر روی این نتایج نشان می دهد که فراوانی آلل a و فراوانی ژنوتیپ ab بین دو گروه به طرز معنی داری متفاوت است ولی بقیه فراوانی ها تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد. بنابراین آلل a از چندشکلی VNTR از اینترون چهارم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی می تواند برای ابتلا به سقط مکرر فاکتور خطری باشد در صورتی که آلل T از چندشکلی Glu298Asp نقشی در ابتلا به سقط ندارد.

#### واژه های کلیدی

چندشکلی،

سقط مکرر،

نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی.

KIR2DS1 (binding lectin) (۱۴) و ژن رسپتور فعال کننده‌ی KIR2DS1 (۱۵) اشاره کرد. نیتریک اکساید (NO) یک مولکول دو اتمی است، که از نظر شیمیایی بسیار فعال است و دارای اثرات فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک مختلفی است. این مولکول در طی تبدیل اسید آمینه آرژنین به سیترولین به وسیله نیتریک اکساید سنتاز آزاد می‌شود. این آنزیم در سه ایزوفرم نیتریک اکساید اندوتلیالی (eNOS (endothelial nitric oxide synthase)، نیتریک اکساید سنتاز نورونی (nNOS (neural nitric oxide synthase) و نیتریک اکساید سنتاز قابل القا (iNOS (inducible nitric oxide synthase) در بدن وجود دارد. NO در تنظیم فشار خون، ترمیم زخم، آپاپتوز، دیابت و غیره دخالت دارد (۱۶). نیتریک اکساید یکی از مهم‌ترین لیگاندهای محرک آنزیم گوانیلات سیکلاز غشایی است که باعث تولید گوانوزین مونوفسفات حلقوی (cyclic guanosine monophosphate) cGMP می‌شود. بنابراین نیتریک اکساید در بسیاری از موارد، نقش خود را از طریق القای تولید cGMP به عنوان پیام رسان ثانویه ایفا می‌کند (۱۶). در بسیاری از بیماری‌های عروقی، فعالیت نیتریک اکساید در سلول‌های اندوتلیوم کاهش می‌یابد. نیتریک اکساید به عنوان یک جزء مهم، در شروع یا پیشرفت این بیماری‌ها دخالت دارد، لذا این مولکول باید در درمان بیماری‌ها به عنوان عاملی بسیار مهم مورد توجه قرار گیرد (۱۷). خاصیت ضد ترومبوزی نیتریک اکساید، با توانایی این مولکول در مهار چسبیدن و تجمع پلاکت‌ها مرتبط است. این عمل تا حدی با تحریک فعالیت cGMP درون پلاکت‌ها و متعاقب آن فسفریله کردن پروتئین‌ها که فعال شدن و چسبیدن پلاکت‌ها را تنظیم می‌کند، اتفاق می‌افتد. پلاکت‌ها خود نیز مقادیر کمی آنزیم نیتریک اکساید سنتاز دارند که با تولید نیتریک اکساید، به صورت یک مکانسیم اتوکراین از فعال شدن پلاکت‌ها جلوگیری می‌کند (۱۷). NO در فرآیندهای مختلف حاملگی مثل لانه‌گزینی (۱۸) نقش دارد و همچنین در قسمت‌های مختلف دستگاه تولیدمثلی پستانداران موثر است. NO در سنتز استروئیدها و فولیکول سازی تخمدان دخیل است (۱۹). گاز NO در رحم نیز ماهیچه‌های صاف میومتری را شل نموده، از تجمع پلاکت‌ها ممانعت به عمل می‌آورد و نقش مهمی در التهاب بازی می‌کند. از طرف دیگر این مولکول بهترین کاندید برای تاثیر هورمون‌های

یکی از مشکلات معمول دوران بارداری، سقط مکرر<sup>۱</sup> است که در ۱ تا ۳ درصد از حاملگی‌ها اتفاق می‌افتد و جنین در سه ماهه اول حاملگی و معمولاً قبل از هفته بیستم سقط می‌شود (۱). سقط مکرر زمانی گفته می‌شود که فرد قبل از هفته بیستم حاملگی سه یا بیشتر سقط متوالی داشته باشد. محققان عوامل مختلفی مثل عوامل محیطی، عوامل پاتولوژیک و عوامل ژنتیکی را در بروز این عارضه دخیل می‌دانند (۱). از عوامل پاتولوژیک می‌توان به عوامل ایمنولوژیک مثل بیماری‌های اتوایمن، سندرم آنتی فسفولیپید و اریتروماتوز لپوسی<sup>۲</sup> (۱)، ناهنجاری‌های آناتومیک شامل رحم دو شاخ، چسبندگی‌های رحمی که به عنوان سندرم Asherman مطرح است، وجود پلیپ‌های اندومتری، فیبروئیدهای زیر لوکوسی، آسیب‌های لوله تخمدان و سندرم تخمدان پلی سیستیک (۲)، عوامل عفونی (۳) مشکلات اندوکرینی مثل دیابت، تیروئید، ناکارایی فاز لوتئالی (۳) اشاره کرد.

عوامل ژنتیکی شامل ناهنجاری‌های کروموزومی مثل مونوزومی x، تریزومی‌ها و جا به جایی‌های ساختاری کروموزومی است (۴). اما در میان افرادی که دچار سقط مکرر هستند و برای درمان به مراکز ناباروری مراجعه می‌کنند افرادی نیز هستند که هیچ دلیل خاصی برای سقط آن‌ها وجود ندارد یعنی این‌که از نظر آناتومیک رحم نرمال دارند، مشکلات سیستم ایمنی را ندارند و کروموزوم‌های نرمال دارند. که به این نوع سقط‌ها، سقط مکرر بدون علت گویند. در این موارد مطالعات زیادی در زمینه‌های مولکولی در مورد ارتباط این نوع از سقط‌ها و چندشکلی‌های ژنی در بعضی از ژن‌های کاندید در جمعیت‌های مختلف صورت گرفته است (۵). از جمله این ژن‌ها می‌توان به ژن‌های دخیل در ترومبوفیلی (۶) مهارکننده‌ی فعال کننده‌ی پلاسمینوژن نوع I و فاکتور XIII انعقادی (۷) آنتی ژن‌های ناسازگار بافتی نوع G (HLA-G) (۸) و (۹) خانواده آنزیمی گلوکوتایون S- ترانسفرازها (۱۰)، ایتروکین-۱ (۱۱)، ایتروکین ۶ (۱۲)، ژن سیتوکروم P450 آلفا هیدروکسیلاز (CYP17) (۱۳) ژن کدکننده‌ی پروتئین MBL-2 (Mannose

<sup>1</sup> Recurrent miscarriage, spontaneous abortion

<sup>2</sup> Lupus erythematosus

باعث بروز دو نوع آلل در افراد می‌شود آلل T و آلل G که ارتباط آن با بیماری‌های مختلف مثل سکتة قلبی (۳۰)، قطع ناگهانی جفت (۳۱) و پری‌اکلامپسی (۳۲) نشان داده شده است. از آنجائی که NO برای تثبیت و ادامه حاملگی لازم است و با توجه به نقش‌های مهمی که ترکیب نیتریک اکساید در سیستم تولید مثلی پستانداران دارد و نیز ارتباط چندشکلی این ژن با سقط مکرر در بعضی از جمعیت‌ها نشان داده شده است و با توجه به اینکه در کشور ما جمع زیادی از خانم‌ها دچار سقط‌های مکرر بدون علت هستند ما تلاش کردیم که در این مطالعه ارتباط چندشکلی‌های 4VNTR و Glu298Asp از ژن NOS3 و سقط مکرر در زنان مبتلا به عارضه سقط مکرر بدون علت در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار دهیم.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌گیری

ما در این مطالعه از خانم‌هایی که سه یا بیش‌تر سقط مکرر خودبه‌خودی با دلایل نامعلوم داشتند به‌عنوان گروه بیمار استفاده کردیم، این خانم‌ها افرادی بودند که برای درمان به پژوهشگاه رویان مراجعه کرده بودند و تمامی آزمایشات روتین برای تشخیص علت سقط بر روی آن‌ها صورت گرفته بود. این آزمایشات شامل کاریوتایپینگ زوجین، آزمایشات سرولوژیک، آزمایشات هورمونی، بررسی ناهنجاری‌های رحمی و تست‌های آنتی‌کواگولانت آنتی‌کاردیولپین و آزمایشات میکروبی بود. گروه کنترل نیز شامل ۱۰۰ زن بود که دارای حاملگی نرمال بوده و حداقل دو فرزند سالم داشتند. همچنین رضایت‌نامه انجام تحقیقات از هر دو گروه اخذ شده بود. مشخصات گروه کنترل و بیمار در جدول ۱ نشان داده شده است.

#### استخراج DNA

به‌منظور بررسی کردن چندشکلی‌های ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در این دو گروه، DNA ژنومی آن‌ها از لوکوسیت‌های خون محیطی آن‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA که از شرکت Metabion (mi-Blood Genomic DNA Isolation Kit) تهیه شده بود، استخراج شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد.

استروئیدی در اندومتر و بافت دزی دوآ می‌باشد (۲۰). در طی حاملگی، تولید NO در سلول‌های اندوتلیالی افزایش پیدا می‌کند و احتمالاً نقش مهمی در تشکیل جفت دارد همچنین به‌وسیله ریلکساسیون میومتر و رگ‌زایی نقش مهمی در تنظیم فشار خون جفتی دارد. همچنین نیتریک اکساید سنتاز در سلول‌های تروفوبلاستی سنتز می‌شود و مستقیماً یا از طریق میانکنش با سیکلو‌اکسیژنازها از انقباضات میومتر رحم جلوگیری می‌کند (۲۱). از طرف دیگر نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در رگ‌های ویلوسی و در سینسیتوتروفوبلاست زنان حامله بیان می‌شود و تولید گنادوتروپین جفتی انسان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۲). چندشکلی‌های ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی با بعضی از بیماری‌ها در ارتباط است، دیده شده که چندشکلی‌های این ژن با افزایش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی مانند فشار خون بالا و بیماری عروقی قلب همراه است (۲۳). ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی بر روی کروموزوم شماره ۷ قرار دارد (-7q35-q36) (۴۴) و به‌عنوان یک ژن تک کپی که ۲۶ تا اگزون دارد مطرح است طول کل آن ۲۱ کیلو باز است (۲۴). تخریب ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی باعث فشار خون بالا در موش می‌گردد (۲۵) چند شکلی‌های ژنی موجود در ناحیه کدکننده و غیر کدکننده ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی می‌تواند بیان این ژن و یا فعالیت آن را تغییر دهد و بنابراین باعث کاهش تولید NO شود (۲۶) که می‌تواند افراد را برای ابتلا به فشار خون بالا، اسپاسم رگ، آترواسکلروزیز، پری اکلامپسی مستعد نماید (۲۷،۲۸) دو تا از شایع‌ترین چندشکلی‌های این ژن چندشکلی VNTR در ایترون چهارم و یک چندشکلی تک نوکلئوتیدی (Glu298Asp) در اگزون هفتم این ژن است. مشاهده شده که چندشکلی VNTR با میزان کم متابولیت‌های پلاسمایی NO همراه است (۳۱). در برخی از جمعیت‌ها نیز دیده شده است که این چندشکلی با سقط مکرر مرتبط است به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ در زنان اتریشی صورت گرفت وجود این ارتباط تایید شد (۲۹) همچنین در زنان چینی نیز وجود ارتباط بین ال a از این چندشکلی و سقط مکرر نشان داده شد (۳۸) از طرف دیگر چندشکلی Glu298Asp یک جابه‌جایی است که

جدول ۱- مشخصات مربوط به زنان مورد مطالعه در این بررسی

گروه بیمار	گروه کنترل	
۳۱ / ۷	۲۹ / ۲	میانگین سنی
۴	۰	میانگین تعداد سقطها
ندارند	ندارند	مصرف سیگار
ندارند	ندارند	مصرف الکل
از همه اقوام ایرانی	از همه اقوام ایرانی	قومیت

روش طیف‌سنجی

در این روش ابتدا دستگاه اسپکتوفتومتر بوسیله ۱۰۰ میکرولیتر از حلالی که DNA در آن حل شده بود، (آب مقطر یا Tris یا Elution Buffer) کالیبر شد.

سپس از هر نمونه، به اندازه ۲ میکرولیتر از DNA در ۹۸ میکرولیتر از همان حلال حل شد و به دستگاه داده شد تا جذب آن خوانده شد.

واکنش PCR

واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای قسمتی از ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی ایترون چهارم این ژن صورت گرفت، در مورد چندشکلی VNTR آغازگرهای استفاده شده عبارتند از '5'AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT3' که به عنوان آغازگر پیشرو استفاده شد و '5'TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC3' آغازگر پیرو می‌باشد (۳۵). (آغازگرها از شرکت MWH و از کشور دانمارک تهیه شدند). حجم نهایی PCR برای هر نمونه ۲۵ میکرولیتر بود که شامل:

MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی مولار)، dNTP mix (۱۰ میلی مولار)، آغازگر هرکدام (۱۰۰ پیکومول بر ماکرولیتر) و DNA پلیمرز (U/M15)، DNA (۲۰۰ μg/ml) بود. (تمام واکنش‌گرهای PCR از شرکت سیناژن تهیه شدند). سپس در دستگاه ترموسایکلر مدل (Germany, Eppendorf, Mastercycler gradient) قرار داده شدند برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول شماره ۲ آورده شده است. پس از تکثیر ۸ میکرولیتر از محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد به مدت ۴۵ دقیقه و با ولتاژ ۱۲۰ ولت با استفاده از دستگاه Bio-Rad الکتروفورز شده و توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با استفاده دستگاه ترانس لومیناتور UVidoc مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). آلل

بزرگتر ۵ تکرار از توالی تکراری دارد که هر توالی ۲۷ جفت باز دارد و به ال b معروف است که، در حالی که آلل کوچکتر ۴ تکرار دارد و به a معروف است.

واکنش RFLP-PCR

تعیین ژنوتیپ چندشکلی Glu298Asp با استفاده از روش PCR-RFLP صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی '5'CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC3' به عنوان آغازگر پیشرو و '5'AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC3' به عنوان آغازگر پیرو مورد استفاده قرار گرفتند (۳۵) (MWH-Denmark). حجم نهایی محصول PCR برای هر نمونه ۵۰ میکرولیتر بود غلظت نهایی مواد به صورت زیر بود: MgCl<sub>2</sub> (۵۰ میلی مولار)، dNTP mix (۱۰ میلی مولار)، آغازگر هرکدام (۱۰۰ پیکومول بر ماکرولیتر) و DNA پلیمرز (U5)، DNA (۲۰۰ μg/ml) بود. (تمام واکنش‌گرهای PCR از شرکت سیناژن تهیه شدند). برنامه حرارتی این واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول ۳ آورده شده است. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز و رنگ-آمیزی شد و محصول PCR به وسیله آنزیم MboI به غلظت ۱۰ U/μl که از شرکت Fermentase تهیه شده بود به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و نتیجه آن بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم برماید بررسی شد. در این حالت در صورتی که در مکان ۸۹۴ از این توالی محصول PCR، نوکلئوتید T وجود داشته باشد، محصول ۲۰۶ جفت‌بازی به ۲ قطعه ۱۱۹ و ۸۷ می‌شکند و اگر نوکلئوتید G وجود داشته باشد برش نمی‌خورد که در این حالت سه ژنوتیپ مورد انتظار است (GG=هوموزیگوت سالم، GT=هتروزیگوت، GT=هوموزیگوت غیر نرمال) (شکل ۲).

## بحث و نتایج

مطالعه استفاده شد. به منظور تعیین همبستگی بین فراوانی آللی و سقط از نسبت Odd (odd ratio) استفاده شد.

بررسی چندشکلی VNTR و SNP از ۱۰۰ نمونه بیمار و ۱۰۰ نمونه کنترل نشان داد که فراوانی ژنوتیپ‌های aa, ab, bb چندشکلی VNTR به ترتیب ۶۳ درصد و ۳۳ درصد، ۴ درصد در گروه مبتلا و ۷۹ درصد، ۱۸ درصد، ۳ درصد در گروه کنترل و فراوانی آلل a در گروه بیمار ۲۰/۵ درصد و در گروه کنترل ۱۲ درصد می‌باشد در این حال فراوانی آلل b در گروه بیمار ۷۹/۵ درصد و در گروه کنترل ۸۸ درصد است. بنابراین معلوم شد که توزیع فراوانی ژنوتیپی ژنوتیپ ab بین گروه بیمار و کنترل به صورت معنی‌داری متفاوت است ( $P=۰/۰۳۷$ ) (جدول ۴) و فراوانی آللی، آلل a نیز در گروه بیمار از گروه کنترل بیشتر است ( $P=۰/۰۲۳$ , OR=۱/۸۹) (جدول ۶). در ارتباط با چندشکلی Glu298Asp معلوم شده است که فراوانی ژنوتیپی آن بین گروه کنترل و بیمار اختلاف معنی‌داری ندارد ( $P=۰/۱۷۹۵$ ). فراوانی ژنوتیپ GG در گروه کنترل ۶۸ درصد و در گروه بیمار ۷۱ درصد است. فراوانی ژنوتیپ GT در گروه کنترل ۲۹ درصد و در گروه بیمار ۲۵ درصد و فراوانی ژنوتیپ TT در گروه کنترل ۳ درصد و در گروه بیمار ۴ درصد می‌باشد. نتایج در جدول ۵ آمده است. فراوانی آللی این چندشکلی نیز اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. فراوانی آلل G در گروه بیمار ۵/۸۳ درصد و در گروه کنترل ۸۲/۵ درصد است و فراوانی آلل T در گروه کنترل ۱۷/۵ درصد و در گروه بیمار ۱۸/۵ درصد است که اختلاف معنی‌داری را بین دو گروه نشان نمی‌دهد. ( $P=۰/۳۵۵$ , OR=۱/۳۰۴) (جدول ۶). ما در این مطالعه تلاش کردیم برای اولین بار در جمعیت زنان ایرانی ارتباط بین دو مورد از چندشکلی‌های ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و سقط مکرر را در خانم‌های مبتلا به این عارضه بررسی کنیم. نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی آنزیمی است که تبدیل اسید آمینه آرژنین به سیتروکالین را کاتالیز می‌کند که در این مسیر نیتریک اکساید به‌عنوان محصول جانبی واکنش آزاد می‌شود. در یک حاملگی نرمال مسیر تولید NO فعال می‌شود که در نتیجه آن میزان NO موجود افزایش می‌یابد به این ترتیب بدون اینکه

جدول ۲- برنامه حرارتی مربوط به PCR اینترون چهارم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی

شماره	عملیات	دما	زمان
۱	Initiation Denaturation	۹۵ °C	۱۰ دقیقه
۲	Denaturation	۹۴ °C	۳۰ ثانیه
۳	Annealing	۵۰ °C	۳۰ ثانیه
۴	Extension	۷۲ °C	۴۰ ثانیه
تکرار ۳۵			
۵	Final Extension	۷۲ °C	۱۰ دقیقه
۶	Hold	۱۰ °C	

جدول ۳- برنامه حرارتی مربوط به PCR اگزون هفتم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی

شماره	عملیات	دما	زمان
۱	Initiation Denaturation	۹۵ °C	۱۰ دقیقه
۲	Denaturation	۹۴ °C	۳۰ ثانیه
۳	Annealing	۵۰ °C	۳۰ ثانیه
۴	Extension	۷۲ °C	۴۰ ثانیه
تکرار ۳۵			
۵	Final Extension	۷۲ °C	۱۰ دقیقه
۶	Hold	۱۰ °C	

تعیین توالی

به منظور تأیید نتایج حاصل از RFLP و هضم آنزیمی، ۱۵ عدد از نمونه‌ها تعیین توالی شدند. به این منظور این نمونه‌ها برای تعیین توالی به بخش PGD از پژوهشگاه رویان فرستاده شدند، که در آن‌جا با روش Automated DNA Sequencing که در واقع همان روش اتومات سنگر است، تعیین توالی صورت گرفت. دستگاهی که با آن تعیین توالی صورت گرفت، به نام 3130 Genetic Analyzer (4-capillary Array) Applied Biosystems معروف است.

جدول ۴- بررسی توزیع فراوانی ژنوتیپ‌های حاصل از چندشکلی VNTR در گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ	بیمار تعداد: ۱۰۰ نفر	کنترل تعداد: ۱۰۰ نفر	P value
4VNTR			
bb	۶۳	۷۹	۰/۰۳۷
ab	۳۳	۱۸	
aa	۴	۳	

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج حاصل از گروه بیمار و کنترل با استفاده از نسخه‌ی ۱۶ نرم افزار آماری SPSS مورد بررسی قرار گرفت، در این بررسی حدود معنی‌داری زیر ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و با حدود اطمینان ۹۵ درصد از آزمون دقیق فیشر برای این

نقشی که نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در مراحل اول حاملگی دارد بنابراین بررسی ارتباط بین چندشکلی های ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی و سقط مکرر بدون علت منطقی به نظر می رسد. یکی از چندشکلی های ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی، چندشکلی VNTR در ایترون چهارم این ژن است. هرچند یک سری از ارتباطات فنوتیپی-ژنوتیپی در مورد چندشکلی ایترون چهارم از ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی شرح داده شده ولی مکانیسم دقیق آنها هنوز مشخص نیست. دو نمونه از مکانیسم های احتمالی تغییر در تعداد تکرارهای ۲۷ جفت بازی ایترون چهارم ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی است که ممکن است باعث تغییر در سطح اسپلایسینگ و پردازش رونوشت اولیه شده و محصول پروتئینی نادرستی تولید کند همچنین این تغییر ممکن است باعث بروز تغییر در توالی های افزایشنده یا کاهشنده بیان ژن شده و میزان بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد همان طور که مشاهده شده چندشکلی VNTR باعث کاهش میزان متابولیت های پلاسمایی NO می گردد (۳۱). از آنجایی که نیتریک اکساید در سیستم های عروق بدن نقش شل کنندگی دارد و در سیستم گردش خون جفتی-جنینی باعث انتقال خون به جنین می شود اختلال در تولید نیتریک اکساید باعث می شود جریان خون از جفت به جنین دچار اختلال شود و بنابراین ممکن است باعث عدم تغذیه جنین در مراحل اول حاملگی شده و باعث سقط شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که فراوانی حاملان هتروزیگوت که ژنوتیپ ab دارند و فراوانی آلل معیوب a از چندشکلی VNTR در گروه مبتلا از گروه کنترل بیش تر است البته با توجه به اینکه سقط مکرر عارضه ای چندژنی است وجود این چندشکلی به تنهایی برای سقط کافی نیست. مشابه این نتیجه در سال ۲۰۰۱ توسط Tempfer و همکارانش به دست آمد (۲۹) در این مطالعه که بر روی زنان مبتلا به سقط مکرر بدون علت صورت گرفت معلوم شد که افراد هتروزیگوت از چندشکلی نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی نسبت به افراد سالم به اندازه ۱/۶ برابر در افزایش خطر ابتلا به سقط مکرر قرار دارند. در چین نیز نتیجه مشابهی به دست آمد (۴۲) و مشاهده شد که در زنان چینی مبتلا به سقط مکرر فراوانی هتروزیگوت های ab و هموزیگوت های aa نسبت به زنان نرمال به طرز معنی داری بیش تر است. همچنین در مطالعه ای که

فشار خون مادر افزایش یابد حجم خون در حال گردش در حین حاملگی افزایش می یابد.

جدول ۵- بررسی توزیع فراوانی ژنوتیپ های حاصل از چندشکلی Glu298Asp در گروه بیمار و کنترل

ژنوتیپ	بیمار	کنترل	P value
تعداد: ۱۰۰ نفر			
Glu298Asp			
GG	۷۱	۶۸	
GT	۲۵	۲۹	۰/۰۷۹۵
TT	۴	۳	

جدول ۶- بررسی توزیع فراوانی آللی چندشکلی های NOS3 بین گروه کنترل و بیمار

چندشکلی	آلل	بیمار	کنترل	odds ratio(95%)	pvalue
4VNTR					
	a	٪۲۰/۵	٪۱۲	۸۹/۱	۰/۰۲۳
	b	٪۵/۷۹	٪۸۸		
Glu298Asp					
	G	٪۸۳/۵	٪۸۲/۵	٪۳۰۴/۱	۰/۳۵۵
	T	٪۱۶/۵	٪۱۷/۵		

در تخمدان ایزوفرم اندوتلیالی نیتریک اکساید سنتاز روی سطح اووسیت ها در سلول های تکا و استرومای فولیکول های در حال رشد وجود دارد و در سنتز استروئیدها در تخمدان و بلوغ تخمک موثر است (۳۳). در اویداکت، افزایش انقباضات ماهیچه های اویداکتی در حضور بازدارنده های نیتریک اکساید سنتازها، اولین نشانه حضور NO در اویداکت و نقش فیزیولوژیک NO در تنظیم اعمال اویداکت می باشد (۱۹). آنزیم NO سنتاز اندوتلیالی، در جفت انسان شناسایی شده است (۳۴) و احتمالاً تولید هورمون های جفتی را تنظیم می کند. با مهار سنتز نیتریک اکساید فشار خون موضعی تخمدان تغییر یافته و بلوغ تخمک دچار مشکل می گردد (۴۰). فقدان ژن نیتریک اکساید سنتاز اندوتلیالی در مراحل اولیه نمو جنین و بقای آن اثر منفی دارد (۴۱) در خرگوش مشاهده شده که مهار تولید NO در حین حاملگی باعث افزایش فشار خون مادر و عدم رشد جنین می گردد (۴۳) سقط مکرر بدون علت عارضه ایی است که توسط ژن های مختلف کنترل می شود و تاکنون دلیل خاصی برای آن شناخته نشده است به همین علت در جمعیت های مختلف ارتباط چندشکلی های ژن های مختلف با این عارضه مورد بررسی قرار گرفته است. به دلیل

در جمعیت‌های یونانی (۳۷) و تونسی (۳۸) است. در این جمعیت‌ها نیز ارتباطی بین این چندشکلی و سقط مکرر یافت نشد. بنابراین با این نتایج و نتایج به دست آمده در جمعیت‌های دیگر و با توجه به نقشی که NO در مراحل اولیه حاملگی دارد می‌توان گفت که آلل نادر a از چندشکلی VNTR احتمالاً در بروز پدیده سقط مکرر نقش معنی‌داری دارد و آلل T از چندشکلی Glu298Asp تاثیری در سقط مکرر ندارد کسب چنین نتیجه‌ایی می‌تواند به شناسایی بیش‌تر زنان مستعد کمک کند و به عنوان مطالعه‌ایی پایه در بررسی‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

#### سپاسگذاری

بدین‌وسیله از آزمایشگاه ژنتیک مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشگاه رویان به خاطر مساعدت‌ها و کمک‌هایشان و آقای حامد وزیری از گروه PGD مولکولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان به خاطر تعیین توالی نمونه‌ها قدردانی می‌شود.

#### منابع

1. S.Brerak J, (2002) Novak 's Gynecology (Hardcover) .Chapter 8.
2. Aruna Meka, B.M.R. (2006). Recurrent spontaneous abortion: An overview of genetic and non- genetic background. Indian Journal of Human Genetics., 6(2): 109-117
3. Dhont M (2003) Recurrent miscarriage. Curr Womens Health Rep, 3(5): 361-6
4. Stephenson M D, Awartani K A, Robinson W P (2002) Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. Hum Reprod, 17(2): 446-51.
5. Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Sakuragi N, Fujimoto S (2001). Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. Semin Thromb Hemost, 27(2): 121-9.
6. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I (2003) Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. Lancet, 361(9361): 901-8.
7. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, Huber J, Hopmeier P (2003) Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early pregnancy loss. Clin Chem, 49(7): 1081-6.
8. Pfeiffer KA, Fimmers R, Engels G, van der Ven H, van der Ven K (2001). The HLA-G genotype is potentially

associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion. Mol Hum Reprod, 7(4): 373-8.

9. Aldrich CL, Stephenson MD, Karrison T, Odem RR, Branch DW, Scott JR, Schreiber JR, Ober C (2001) HLA-G genotypes and pregnancy outcome in couples with unexplained recurrent miscarriage. Mol Hum Reprod, 7(12): 1167-72.

10. Hayes J D, Strange R C (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. Pharmacology, 61(3): 154-66.

11. Mosmann T R, Coffman R L (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, 7: 145-73.

12. Saijo Y, Sata F, Yamada H, Kondo T, Kato EH, Kishi R (2004) Single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the interleukin-6 gene and the risk of recurrent pregnancy loss in Japanese women. Fertil Steril, 81(2): 374-8.

13. Sata F, Yamada H, Yamada A, Kato EH, Kataoka S, Saijo Y, Kondo T, Tamaki J, Minakami H, Kishi R (2003). A polymorphism in the CYP17 gene relates to the risk of recurrent pregnancy loss. Mol Hum Reprod, 9(11): 725-8.

14. Kilpatrick D C, Bevan B H, Liston W A (1995). Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. Hum Reprod, 10(9): 2501-5.

15. Wang S, Zhao Y R, Jiao YL, Wang LC, Li JF, Cui B, Xu CY, Shi YH, Chen ZJ (2007) Increased activating killer immunoglobulin-like receptor genes and decreased specific HLA-C alleles in couples with recurrent spontaneous abortion. *Biochem Biophys Res Commun*, 360(3):696-701.
16. Wink D A, Mitchell J B (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 25(4-5): 434-56.
17. Maxwell A J (2002) Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Nitric Oxide*, 6(2): 101-24.
18. Chwalisz K, Garfield R E (2000) Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Hum Reprod*, 15 Suppl 3: 96-111.
19. Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK (1994) Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem Biophys Res Commun*, 202(3):1543-52.
20. Peng AT, Gorman RS, Shulman SM, DeMarchis E, Nyunt K, Blancato LS (1989) Intravenous nitroglycerin for uterine relaxation in the postpartum patient with retained placenta. *Anesthesiology*, 71(1): 172-3.
21. Conrad K P, Vill M, McGuire PG, Dail WG, Davis AK (1993) Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi. *FASEB J*, 7(13):1269-76.
22. Rossmnith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, Mclean M (1999) Expression and functional analysis of endothelial (eNOS) in human placenta. *Mol Hum Reprod*, 5(5):487-94
23. Ichichara S, Yamada Y, Fjimura T, Nakashima N, Yokoda M (1998) Association of a polymorphism of the constitute nitric oxide synthase with myocardial infarction in the Japanese population. *Am J Cardiol*, 81(1):83-6
24. Marsden PA, Heng H H, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, Schappert K T (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 268, 17478-17488.
- 25- Van Vliet BN, Chafe LL (2007). Maternal endothelial nitric oxide synthase genotype influences offspring blood pressure and activity in mice. *Hypertension* 49, 556-562.
- 26- Logan JF, Chakravarthy U, Hughes AE, Patterson C.C, Jackson JA, Rankin SJ (2005). Evidence for association of endothelial nitric oxide synthase gene in subjects with glaucoma and a history of migraine. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46,3221-3226.
- 27- Wang XL, Wang J (2000). Endothelial nitric oxide synthase gene sequence variations and vascular disease. *Mol. Genet. Metab.* 70, 241-251.
- 28- Xin Y, Song X, Xue H, Liu Z, Wang X, Wang H, Sun K, Bai Y, Liu J, Hui R. (2009) A common variant of the eNOS gene (E298D) is an independent risk factor for left ventricular hypertrophy in human essential hypertension. *Clin. Sci. (Lond.)* 117,6773.
29. Tempfer C, Unfried G, Nagele F, Huber C (2001) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod*, 16(8):1644-7
30. Shimashaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K (1998) Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide gene with myocardial infarction. *JACC*, 31:1506-1510
31. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Yasue H, Okamura H (2001) The missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with placental abruption. *Hum Genet*, 108(3):181-3.
32. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Okamura H (2000) Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*, 7(4):238-41
33. Jablonka-Shariff A, Olson L M (1998) The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*, 139(6): 2944-54.
34. Myatt L, Langdon G, Brewer A S, Brockman D E (1992) Characterization of the nitric oxide synthase enzyme in the human placental villous vascular tree. In *The Biology of Nitric Oxide*: 347-351.
35. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T (1998). Evidence of association of the ecNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in human *Biochem Biophys Res Commun*, 245(1):190-3
36. Tessaro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J (2000) Intracellular processing of endothelial constitutive nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6):2832-5.
37. Karvela M, Papadopoulou S, Tsaliki E, Konstantakou E, Hatzaki A, Florentin L, Lamissou K (2008) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions. *Arch Gynecol Obstet*, 278(4): 349-52.
38. Zammiti W, Mtiraoui N, and Mahjoub T (2008) Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in tunisian women. *Am J Reprod Immunol*, 59(2): 139-45.
39. Wang XL, Sim AS, Badenhop RF, McGredie RM, Wilchen DEL (1996) A smoking dependent risk of coronary artery disease associated with a polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene. *Nat Med*, 2(1):41-5
40. Jablonka-Shariff A, Ravi S, Beltsos AN, Murphy LL, Olson LM (1999) Abnormal estrous cyclicality after disruption of endothelial and inducible nitric oxide synthase in mice *Biol Reprod*, 61(1):171-7
41. Tempfer C, Moreno RM, O'Brien WE, Gregg AR (2000b) Genetic contributions of the endothelial nitric



oxide synthase gene to ovulation and menopause in a mouse model. *Fertil Steril*, 73(5):1025-31.

42. Fan W, Li SW, Wang Y. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* (2007) Association of genetic polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase 3 gene with recurrent early spontaneous abortion Feb, 24(1):23-6.

43. Yallampalli C, Garfield R.E (1993) Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169, 1316-1320.

44. F Parveen, RM Faridi, S Alam, S Agrawal (2009) Genetic analysis of eNOS gene polymorphisms in association with recurrent miscarriage among North Indian women *Reproductive BioMedicine*.