

بررسی حذف ۴۹۷۷-bp در DNA میتوکندریایی زنان دچار سقط خودبه خودی

نسرین غنمی گشتی (MSc)^۱ - دکتر زیور صالحی (MD, PhD)^۱ - *دکتر زیبا ظهیری سروری (MD)^۲ - الیزا اسکافی ثابت (MSc)^۱

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

پست الکترونیک: zibazahisorouri@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۴/۳۱

چکیده

مقدمه: سقط خودبه خودی به معنی ختم حاملگی قبل از هفته بیستم بوده که با مرگ جنین همراه است. کم‌بیش ۵۰-۳۰٪ لقاح در انسان به سقط خودبه خودی منجر می‌شود که بیشتر این سقط‌ها در زمان لانه‌گزینی و مرتبط با استرس اکسیداتیو رخ می‌دهند. استرس اکسیداتیو می‌تواند به DNA میتوکندریایی (mtDNA) آسیب وارد کند. آنزیم‌های زنجیره تنفسی ناقص که توسط smtDNA دارای حذف می‌شوند، ممکن است منجر به افزایش استرس اکسیداتیو شود.

هدف: بررسی حذف ۴۹۷۷-bp یا حذف عمومی در mtDNA لکوسیت‌های زنان دچار سقط جنین خودبه خودی

مواد و روش‌ها: DNA ژنومی از نمونه خون ۱۵۰ زن دچار سقط خودبه خودی و ۹۰ کنترل استخراج شد. حذف ۴۹۷۷-bp در mtDNA از روش Gap-PCR و جفت پرایمر طراحی شده توسط نرم‌افزار oligo7 استفاده و آنالیز آماری با نرم‌افزار MedCalc انجام شد.

نتایج: در ۴۵ نفر (۳۰٪) از زنان مبتلا به سقط خودبه خودی حذف ۴۹۷۷-bp در mtDNA و تنها در ۶ نفر (۶/۶۶٪) از افراد کنترل وجود داشت. ارتباط معنی‌داری بین این حذف و افزایش خطر سقط خودبه خودی بدست آمد (OR=۶/۰۰،٪۹۵ (CI)=۲/۴۴ - ۱۴/۷۴ P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: در این مطالعه ارتباطی قوی بین حذف ۴۹۷۷-bp و سقط خودبه خودی بدست آمد گرچه، برای تعیین ارتباط بین این حذف و سقط خودبه خودی لازم است مطالعه در جمعیت‌های بزرگ‌تر انجام شود.

کلید واژه‌ها: استرس اکسیداتیو/دی ان ا میتوکندریال/سقط خودبه خودی

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و دوم شماره ۸۸ صفحات: ۱-۶

مقدمه

در حالت عادی بین تولید رادیکال‌های آزاد در بدن و دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدان توازن برقرار است. رادیکال‌های آزاد، مولکول‌هایی هستند که به علت داشتن الکترون‌های آزاد، بسیار واکنش‌پذیر بوده و می‌توانند آسیب‌های فراوانی به ماکرومولکول‌های بدن از جمله DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها وارد کنند. این عوامل با ایجاد واکنش‌های آبشاری که باعث تخریب سلول می‌شوند در نهایت منجر به بیماری می‌شوند (۴). در صورت برهم خوردن توازن تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی، استرس اکسیداتیو بروز می‌کند. یکی از انواع اصلی و مهم رادیکال‌های آزاد، گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر یا Reactive (ROS) Oxygen Species است. گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر شامل پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های آزاد ناپایدار (مانند رادیکال هیدروکسیل و آنیون سوپراکسید) است که الکترون

سقط به معنای پایان یافتن زود هنگام بارداری، پیش از توان ادامه حیات جنین است. طبق تعریف سازمان جهانی بهداشت، سقط به معنی ختم حاملگی پیش از هفته بیستم یا تولد جنین با وزن زیر ۵۰۰ گرم است (۱). سقط خودبه خودی به معنای خاتمه بارداری بدون دخالت هیچ نوع عامل خارجی است که در بیشتر موارد در سه ماهه اول بارداری رخ می‌دهد. مکانیسم دقیق وقوع سقط مشخص نیست. به طور کلی ۵۰ درصد سقط‌های خودبه خودی تکرار شونده بوده و بدون دلیل مشخص رخ می‌دهند (۲). از دلایل سقط می‌توان به ناهنجاری‌های کروموزومی جنین، نارسایی‌های رحمی، عفونت، اختلال انعقاد خون، دلایل متابولیک و عوامل محیطی اشاره کرد. عوامل محیطی ۳ درصد دلایل سقط را دربر می‌گیرند (۳). و شامل نوع تغذیه، سموم محیطی، اعتیاد، مواجهه با اشعه یونیزه‌کننده و استرس اکسیداتیو است.

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

خودبه‌خودی که با تشخیص پزشک متخصص زنان انتخاب و معرفی شدند. بیماران با سقط‌هایی غیر از سقط خودبه‌خودی که دلیل خاصی برای سقط در آنان وجود داشت، از مطالعه حذف شدند. گروه دوم شامل ۹۰ زن بدون سابقه سقط و بیماری‌های رحمی بود که دست‌کم یک فرزند داشتند که به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. از بیماران و کنترل، ۲ میلی‌لیتر خون گرفته و در نونجکت‌های EDTA coated ذخیره شد. بخشی از نمونه‌های مورد نظر از بیمارستان الزهراء رشت و سایر آنها از مطب پزشک متخصص زنان تهیه شد. ویژگی افراد بیمار و کنترل و همچنین رضایت آنان مبنی بر شرکت در این پژوهش، در قالب پرسشنامه‌ای جمع‌آوری شد.

استخراج DNA ژنومی از خون

برای استخراج DNA ژنومی از خون از کیت Gpp Solution (محصول شرکت ژن پژوهان) استفاده و غلظت DNA استخراج شده با اسپکتروفتومتر تعیین شد. نمونه‌ها تا زمان بررسی‌های مولکولی در دمای 20°C - نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای شناسایی حذف مورد نظر، تکنیک Gap-PCR بکار رفت. یک جفت پرایمر که ناحیه وقوع حذف ۴۹۷۷-bp را احاطه می‌کرد، به کمک نرم‌افزار oligo (Version 7.54, Molecular Biology Insights Inc) طراحی و از شرکت تکاپوزیست (تهران، ایران) تهیه شد. توالی پرایمرها عبارت بود از:

5'-CGGGGGTATACTACGGTC-3'

(forward)

5'-GGTTTCGATGATGTGGTCTT-3'

(reverse).

مواد مورد نیاز این واکنش با غلظت‌های نامبرده در جدول ۱ آمیخته و حجم نهایی را به $25\mu\text{l}$ رساندیم. تکثیر تکه‌های به طول ۴۰۳-bp نشانه حذف ۴۹۷۷-bp در DNA میتوکندریایی و به این ترتیب تکثیر نشدن این تکه نشان‌دهنده حذف نشدن در DNA میتوکندریایی بود. به عبارت دیگر در صورتی که در ناحیه مورد نظر حذف از mtDNA انجام نشده‌باشد، به دلیل دراز بودن این ناحیه، تکثیری صورت نمی‌گیرد.

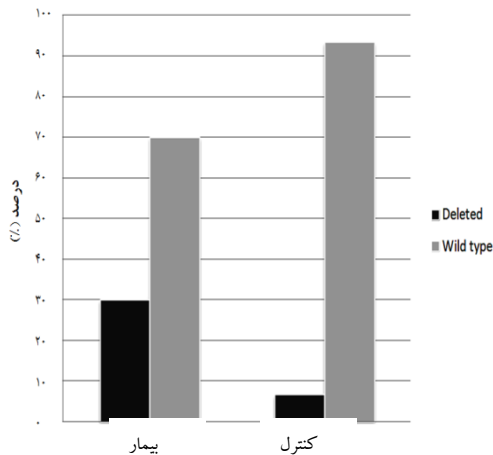
غیرجفت در اوریتال‌های خارجی خود دارند. مطالعات نشان می‌دهد که رادیکال‌های آزاد نقش مهمی در عملکرد درست تخمدان‌ها، لوله‌های فالوپ، بلوغ اووسیت و لقاح دارند. افزایش قابل ملاحظه استرس اکسیداتیو در بافت‌های جنین‌های سقط شده، دیده شده‌است. بنابراین، استرس اکسیداتیو ممکن است در بیماران دچار سقط که دلیل موجهی برای سقط آنها وجود ندارد، نقش داشته‌باشد (۵). ممکن است رادیکال‌های آزاد از متابولیسم جنین و محیط اطراف آن منشأ بگیرند (۴).

میتوکندری از منابع بزرگ ROS در بدن است. جهش‌ها و حذف‌های DNA میتوکندریایی با فرکانس کمتر از ۱٪ رخ داده و با افزایش سن میزان آنها افزایش می‌یابد (۶). یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین حذف‌ها در mtDNA، حذفی به طول ۴۹۷۷-bp است که حذف عمومی (Common Deletion) نامیده می‌شود و در برخی از بیماری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (۸ و ۷). این حذف شامل نوکلئوتید ۸۴۸۳ تا ۱۳۴۵۹ بوده و ژن‌های COII، ATPase 6، ATPase 8، ND3، COIII، ND4L، ND4 و ND5 را در بر می‌گیرد که همگی جزء ژن‌های زنجیره تنفسی هستند. البته شش ژن کد کننده tRNA نیز در بین ژن‌های مذکور قرار دارد. علاوه بر نقش استرس اکسیداتیو، جهش در عوامل همانندسازی mtDNA مانند Twinkle که توسط هسته کد می‌شوند، نیز می‌تواند منجر به چندین حذف در mtDNA شود (۹). آنزیم‌های زنجیره تنفسی ناقص که توسط mtDNA دارای حذف کد می‌شوند، ممکن است منجر به افزایش استرس اکسیداتیو شود. استرس اکسیداتیو ناشی از این حذف ممکن است بر تظاهر بارداری زنان تأثیر داشته باشد. لذا این مطالعه با هدف بررسی حذف ۴۹۷۷-bp در mtDNA لکوسیت‌های زنان مبتلا به سقط جنین خودبه‌خودی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

این تحقیق مطالعه‌ای موردی - شاهدهی بود و از دو گروه نمونه‌خون تهیه شد: گروه اول شامل ۱۵۰ زن با سابقه سقط



شکل ۲. نمودار مربوط به فراوانی وقوع حذف ۴۹۷۷-bp در افراد کنترل و بیمار.

برای بررسی معنی دار بودن این نتایج از آزمون Chi-Square استفاده شد. مقدار χ^2 برای تفاوت فراوانی حذف بین افراد کنترل و بیمار، ۱۶/۹۳ بدست آمد ($P < 0.0001$). بر این اساس، تفاوت بین فراوانی حذف در دو گروه معنی دار بود. در ادامه برای بررسی میزان تأثیر عوامل حذف در mtDNA از آزمون Odds Ratio با نرم افزار MedCalc استفاده شد. نتایج عبارت بود از: $P = 0.0001$ ، $OR = 6.00$ (CI) = ۲/۴۴ - ۱۴/۷۴. بر اساس CI افراد بیمار نشان می دهد. همچنین، بر اساس CI (Confidence Interval) ۲/۴۴ - ۱۴/۷۴ در محدوده حذف در mtDNA لکوسیت ها عوامل خطر برای سقط جنین خودبه خودی محسوب می شود.

جدول ۱. حجم و غلظت مواد مورد استفاده در واکنش PCR.

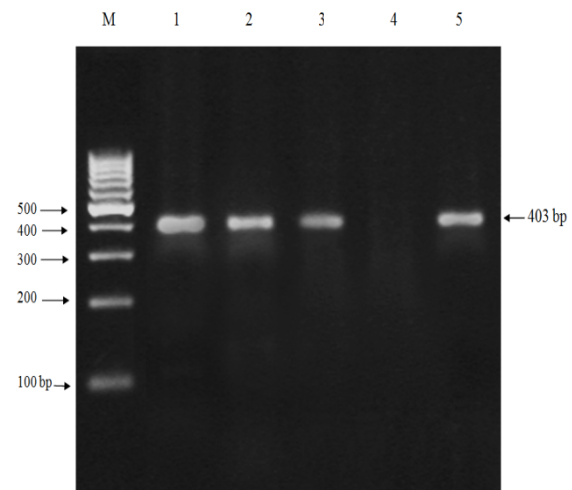
مواد مصرفی	غلظت	حجم (μl)
MgCl ₂	۱/۵ mmol/l	۱/۵
dNTPs	۲۰۰ μmol/l	۱
PCR buffer	۱۰X	۲/۵
Forward Primer	۱۰ pmol/l	۲
Reverse Primer	۱۰ pmol/l	۲
Template DNA	۳۰ ng	۴
Taq DNA Polymerase	۲/۵ IU	۰/۵
Sterile dH ₂ O	-	۱۱/۵
مجموع	-	۲۵

آنالیز آماری

آزمون های آماری χ^2 و Odds Ratio و Chi-Square (OR) با نرم افزار MedCalc (Version 12.1, Mariakerke, Belgium) انجام شد. $P \leq 0.05$ معنی دار بود.

نتایج

میانگین سنی زنان مبتلا به سقط جنین خودبه خودی ۲۹/۸ (محدوده سنی ۱۸-۴۴ سالگی) و میانگین سنی افراد کنترل ۲۷/۴ (محدوده سنی ۲۰-۴۰ سال) بود. تفاوت معنی داری در سن، بین دو گروه وجود نداشت. در مطالعه حاضر، حذف - ۴۹۷۷bp در mtDNA دو گروه بیمار و کنترل، به روش Gap-PCR بررسی و این حذف در هر دو گروه دیده شد (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر ژل آگارز ۲٪ مربوط به محصولات PCR نمونه های بیمار و کنترل جهت بررسی وجود حذف ۴۹۷۷-bp در mtDNA. نشان M نشان مارکر مولکولی است. ظهور باند ۴۰۳-bp در نمونه های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ نشان دهنده وجود حذف ۴۹۷۷-bp می باشد و عدم ظهور این باند در نمونه ۶ نشان دهنده عدم وجود این حذف در این نمونه می باشد.

نمودار مربوط به فراوانی وقوع حذف ۴۹۷۷-bp در افراد کنترل و بیمار در شکل ۲ نمایش داده شده است. از ۱۵۰ زن مبتلا به سقط خود به خودی، ۴۵ نفر (۳۰٪) حذف ۴۹۷۷-bp در mtDNA داشتند در حالی که تنها در ۶ نفر (۶/۶۶٪) از افراد کنترل این حذف وجود داشت.

بحث و نتیجه گیری

یکی از عملکردهای مهم میتوکندری، فسفریلاسیون اکسیداتیو است. این عملکرد برای مراحل اولیه جنین، پیش از لانه‌گزینی، بایسته است (۱۴) و وقوع ناکامل آن ممکن است باعث سقط در مراحل اولیه شود. زیر واحدهای اصلی زنجیره تنفسی میتوکندریایی، توسط ژنوم میتوکندریایی کد می‌شوند. جهش‌های ژنوم میتوکندریایی در افزایش تولید ROS نقش دارند (۱۵). بنابراین، نقش این جهش‌ها در ژنوم میتوکندریایی به عنوان دلیل احتمالی سقط جنین اهمیت دارد. استرس اکسیداتیو به عنوان تقویت‌کننده احتمالی چندین ناهنجاری مرتبط با حاملگی مانند سقط مطرح شده است. از این رو، این مطالعه برای شناسایی ارتباط بین یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین جهش‌های mtDNA یعنی حذف ۴۹۷۷-bp و سقط خودبه‌خودی انجام شد. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین وقوع حذف ۴۹۷۷-bp و سقط خودبه‌خودی بدست آمد. حذف در ژنوم میتوکندریایی لکوسیت‌ها می‌تواند باعث افزایش تولید ROS درون سلولی شده و به طور سیستمی منجر به افزایش استرس اکسیداتیو در بدن شود. از آنجایی که سقط خودبه‌خودی احتمالاً با اختلالی معنی‌دار در توازن اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها همراه است (۱۶)، افزایش استرس اکسیداتیو در بدن مادر ممکن است سبب سقط خودبه‌خودی شود. بنابراین، این حذف در ژنوم میتوکندریایی با افزایش استرس اکسیداتیو، می‌تواند یکی از عوامل دخیل در بروز سقط خودبه‌خودی در جمعیت مورد مطالعه باشد. با این وجود، نتیجه‌ی این تحقیق محدود به جمعیت مورد مطالعه، یعنی جمعیتی از زنان استان گیلان بود و نتیجه‌ی قطعی را باید به مطالعه‌ی جمعیت‌های بزرگ‌تر موکول کرد. نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اهمیت حذف ۴۹۷۷ bp در mtDNA بیماران مبتلا به سقط خودبه‌خودی و مقایسه آنها با افراد کنترل پرداخته شد. ارتباط معنی‌داری بین این حذف و سقط خودبه‌خودی بدست آمد. نتیجه کلی این مطالعه، اهمیت حذف ۴۹۷۷-bp را در mtDNA لکوسیت‌های جمعیت مورد مطالعه در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد.

سقط جنین از مشکلات مهم دوران بارداری است، در حدود ۱۵ درصد کل بارداری‌ها در نهایت به سقط خودبه‌خودی منجر می‌شوند (۱). سقط، عارضه‌ای چندعاملی بوده و مکانیسم دقیق مسئول بروز آن به طور کامل مشخص نیست. مطالعاتی که تاکنون در مورد سقط جنین صورت گرفته، عوامل گوناگونی چون ناهنجاری‌های کروموزومی، اختلال اندوکراین، عوامل ایمونولوژی و ژنتیک را در بروز آن مؤثر می‌دانند (۱۰). تاکنون مطالعات بسیاری نیز در خصوص تأثیر عوامل محیطی، بخصوص استرس اکسیداتیو بر خاتمه پیش از موعد بارداری صورت گرفته است. شیوه‌ی زندگی امروزی، استرس اکسیداتیو محیطی را روز به روز بیشتر کرده است. افزایش کنترل نشده‌ی میزان ROS باعث کلیواژ ناکامل، جدایی غیرطبیعی کروموزوم‌ها و در نتیجه ناهنجاری کروموزوم می‌شود که خود از عوامل مهم سقط جنین بشمار می‌آید (۱۱). با این وجود، استرس اکسیداتیو به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی عوامل رونویسی و بیان ژن‌ها در جنین شناخته شده است (۱۲). قطعه‌قطعه شدن سیتوپلاسمی و افزایش آپوپتوز در جنین، در نتیجه استرس اکسیداتیو گزارش شده است (۱۳).

منابع

1. Schorge JO, Schaffer JL, M. HL, Loffman BL, Bradshaw KD, Cunningham FG. Williams Gynecology. Newyork;Mcgraw Hill, 2008.
2. Qublan HS. Habitual Abortion: Causes, Diagnosis, and Treatment. Gynaecological Practice 2003; 3: 75-80.
3. Kenneth JR. kistner's Gynecology. Principles and Practice. 6th edition. Philadel Phia;Mosby, 1990; 330-365.
4. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of Oxidativestress in Female Reproduction. Reprod Biol Endocrinol 2005; 3: 28.
5. Hempstock J, Jauniaux E, Greenwold N, Burton G. The Contribution of Placental Stress to Early Pregnancy FailureOxidative. Human Pathology 2003; 34: 12.
6. Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging Dependent Large Accumulation of

- Point Mutations in the Human mtDNA Control Region for Replication. *Science* 1999; 286: 774-779.
7. Zeviani M, et al. Deletions of Mitochondrial DNA in Kearns-Sayre Syndrome. *Neurology* 1988; 38: 1339-1346.
8. Moraes CT et al. Mitochondrial DNA Deletions in Progressive external Ophthalmoplegia and Kearns-Sayre Syndrome. *New Engl J Med* 1989; 320: 1293-1299.
9. Quigley A, Reardon K, Kapsa R, Dennett X, Byrne E, Thyagarajan D. A Novel Clinical Phenotype of Myopathy, Sensorimotor Neuropathy, Infertility, and Hypogonadism with Multiple Mitochondrial DNA Deletions. *J Clin Neuromuscul Dis* 2001; 3: 77-82.
10. Qublan HS. Habitual Abortion: Causes, Diagnosis, and Treatment. *Gynaecological Practice* 2003; 3: 75-80
11. Van Blerkom J, Antczak M, Schrader R. The Developmental Potential of the Human Oocyte is Related to the Dissolved Oxygen Content of Follicular Fluid: Association with Vascular Endothelial Growth Factor Levels and Perifollicular Blood Flow Characteristics. *Hum Reprod* 1997; 12: 1047-1055.
12. Dennery PA. Role of Redox in Fetal Development and Neonatal Diseases. *Antioxidant and Redox Signal* 2004; 6: 147-153.
13. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC et al. Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) and Apoptosis in Human Fragmented Embryos. *Human Reproduction* 1998; 13: 998-1002.
14. Jansen RP, deBoer K. The Bottleneck: Mitochondrial Imperative in Oogenesis and Ovarian Follicular Fate. *MOL Cell Endocrinol* 1998; 145: 81-88.
15. Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. Ros-generating Mitochondrial DNA Mutation can Regulate Tumor cell Metastasis. *Science* 2008; 320: 661-664.
16. Agarwal A. Oxidative Stress and its Implications in Female Infertility- a Clinician's Perspective. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 11: 5: 641-650.

Analysis of 4977-bp mitochondrial DNA Deletion in the Women with Spontaneous Abortion

Ghanami Gashti N.(MSc)¹, Salehi Z.(MD, PhD)¹, *Zahiri Sorouri Z.(MD)², Eskafi Sabet E.(MSc)¹

*Corresponding Address: Guilan University of Medical Sciences, Reproductive Health Research Center, Guilan, Rasht, Iran

Email: zibazahisorouri@yahoo.com

Received: 11 Nov/2012 Accepted: 22/Jul/2013

Abstract

Introduction: Spontaneous abortion is a pregnancy ending with the death of fetus prior to 20th week. About 30-50% of human conceptions end in spontaneous abortion and most of them occur at the time of implantation in association with oxidative stress, which can damage mitochondrial DNA (mtDNA). Defective respiratory chain enzymes, encoded by deleted mtDNA, may further enhance oxidative damage.

Objective: Analysis of mtDNA common deletion (4977-bp) in women with spontaneous abortion.

Materials and methods: Genomic DNA was extracted from the blood samples of 150 women with spontaneous abortion and 90 controls; then, subjected to the Gap-PCR technique. A pair of primers designed by means of oligo7 software to flank the region of the mitochondrial genome where the common deletion occurs, was employed. Statistical analysis was performed using MedCalc software.

Results: As revealed, 45 (30%) of women with spontaneous abortion had 4977-bp deletion in mtDNA, while only 6 (6.66%) of the controls were with the deletion. We found that 4977-bp deletion was significantly associated with increased risk of spontaneous abortion (OR= 6.00, 95% confidence interval (CI) = 2.44-14.74, P= 0.0001).

Conclusion: Overall, a strong association between 4977-bp deletion and spontaneous abortion was observed. However, larger population-based studies are needed to further evaluate the relationship between this deletion and spontaneous abortion.

Conflict of interest: non declared

Key words: Abortion, Spontaneous/ DNA, Mitochondrial/ Oxidative Stress

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 88, Pages: 1-6

Please cite this article as: Ghanami Gashti N, Salehi Z, Zahiri Sorouri Z, Eskafi Sabet E. Analysis of 4977-bp mitochondrial DNA Deletion in the Women with Spontaneous Abortion. J of Guilan University of Med Sci 2013; 22(88):1-6. [Text In Persian]

1. Department of Biology, University of Guilan, Faculty of Sciences, Guilan, Rasht, Iran

2. Reproductive Health Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Guilan, Rasht, Iran