پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیست و یکم، شماره ۵، پی‌درپی ۱۱۳، صفحات ۳۲۰ تا ۳۲۶
آذر و دی ۱۳۹۵

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۶/۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۳/۱۰

ارتباط چند شکلی‌های ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی با سندرم سقط مکرر

فاطمه شاکرمی[۱]، فهیمه علیزاده[۲]، دکتر شهره زارع کاریزی[۳]، دکتر محمد تقی اکبری[۴،۵]، دکتر رضا میرفخرایی[۶]*

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
۲. کارشناس ارشد ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
۳. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران
۴. استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۵. آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران- دکتر اکبری، خیابان طالقانی، پلاک ۲۵۱
۶. استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سقط مکرر به معنی از دست دادن سه یا بیش از سه بارداری قبل از هفته بیستم حاملگی است که حدود ۱ تا ۵٪ زنان باردار را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) آنزیمی است که در طی بارداری روی گنادوتروپین جنینی اثر می‌گذارد. مطالعات قبلی وابستگی بین فعالیت eNOS و بارداری را نشان داده است، اما امروزه ارتباط بین چند شکلی‌های این ژن و سندرم سقط مکرر اختلاف نظر وجود دارد. در این مطالعه ارتباط بین پلی‌مورفیسم rs1177443، rs1799983 و VNTR اینترون ۴ ژن eNOS با سقط مکرر جنین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه روی ۸۰ خانم با سابقه دو یا سه سقط مکرر با علت ناشناخته به عنوان گروه بیمار و ۸۰ خانم که حداقل دو بارداری موفق داشته و هیچ زمینه‌ای از سقط نداشتند به عنوان گروه کنترل صورت گرفت. پس از استخراج DNA حضور یا عدم حضور SNPهای مذکور توسط تکنیک PCR-RFLP با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر *Mnl*I و *Ban*II به ترتیب بررسی شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS18 و آزمون مربع کای تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تفاوت معنی‌داری میان پلی‌مورفیسم‌های جایگاه rs11771443 (p=۰/۱۶)، rs1799983 (p=۰/۱۵) و VNTR اینترون ۴ (p=۰/۴۸) ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی در گروه بیمار و گروه کنترل وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست آمده، ارتباط معنی‌داری میان سه پلی‌مورفیسم مذکور ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی و سقط مکرر وجود ندارد.

واژگان کلیدی: ژن نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی، پلی‌مورفیسم، سقط مکرر، شل شدن عضلات صاف

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Shakarami F, Alizadeh F, Zare Karizi S, Akbari MT, Mirfakhraei R. The relationship between polymorphisms of Endothelial Nitric Oxide Synthase gene and recurrent abortion syndrome in Iranian female's population. Pejouhandeh 2016;21(6):320-326.

مقدمه

یکی از معدود مشکلاتی که زندگی زوج‌های جوان را درگیر کرده و جزو شایع‌ترین عوارض حاملگی می‌باشد، مسأله سقط جنین است (۱). از نظر تعریف، سقط ختم حاملگی قبل از هفته بیستم، اطلاق می‌شود (۲). سقط خود به خودی از لحاظ بالینی انواع مختلفی دارد که یکی از آن‌ها سقط مکرر می‌باشد و به طور کلاسیک بدین گونه تعریف می‌گردد: سه سقط متوالی یا بیشتر قبل از هفته بیستم بارداری و یا تولد جنین‌هایی کمتر از ۵۰۰ گرم (۴،۳).

حدود ۱ تا ۵ درصد خانم‌های باردار سقط مکرر را تجربه می‌کنند که ممکن است به دلیل نارسایی‌هایی همچون اختلالات هورمونی، عوامل ایمونولوژیک، عوامل عفونی، عوامل محیطی، عوامل آناتومیکی، عوامل ترومبوفیلی و اختلالات ژنتیکی از جمله ناهنجاری‌های کروموزومی و تک ژنی باشد. این در حالی است که درصد قابل توجهی از عوامل مؤثر در سندرم سقط مکرر ناشناخته باقی مانده است. در میان عوامل شناخته شده سقط مکرر، عوامل ژنتیکی شایع‌ترین عامل است. در مطالعات ژنتیکی مختلف ارتباط بین سقط مکرر و

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر شهره زارع کاریزی؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران؛ تلفن: ۹-۸۸۸۹۶۸۶۸ (۰۲۱)، پست الکترونیک: shohrehzare@yahoo.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی مربوط به بازکننده‌های عروق از جمله نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی (eNOS) نشان داده شده است (۵).

یک حاملگی طبیعی به گردش مناسب خون جفت و عروق جنین وابسته است و عملکرد طبیعی عروق نیازمند همکاری پیچیده بین سلول‌ها و فاکتورهای رشد مختلف در فرآیندهای لانه‌گزینی، رشد جنین و تشکیل جفت است (۶). مطالعات مختلف به نقش آسیب اندوتلیال و اختلال عروق جفت در پاتوژنز سقط اشاره می‌کند. ژن eNOS به عنوان منبع تولید نیتریک اکساید (NO) که نقش مهمی در فیزیولوژی عروق و اختلال عروق جفتی دارد در نظر گرفته شده است (۷). در سال‌های اخیر NO به عنوان یک میانجی مهم در فرآیندهای بیولوژیکی متعدد از جمله عروق، ایمنی و تولید مثل شناخته شده است و در طول بارداری سه عملکرد مهم اتساع و گشادسازی عروق مادر، کنترل جریان خون رحم و فیتوپلاسنتال و آرامش رحم قبل از زایمان را بر عهده دارد.

علاوه بر این، مطالعات آزمایشگاهی اخیر در جوندگان به این موضوع اشاره می‌کند که NO نه تنها از طریق اتساع عروق مادری و شل‌کنندگی عضلات صاف به حفظ بارداری کمک می‌کند، بلکه ممکن است در مهار سیستم ایمنی نقش داشته باشد و به عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی رشد و نمو جنین عمل کند (۸). در یک حاملگی طبیعی، مسیر NO فعال بوده و میزان دسترسی به NO را افزایش می‌دهد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که کاهش تولید NO می‌تواند منجر به اختلال در خون‌رسانی جفت و عرضه‌ی مواد غذایی به جنین شود (۹-۱). اختلالات عروقی جفت ممکن است منجر به عوارض حاملگی نظیر سقط و پره اکلامپسی شود (۱۲).

ژن eNOS در موقعیت کروموزومی 7q35-36 قرار دارد (۷،۶). این ژن دارای ۲۶ اگزون است که در حدود 21kbp از DNA ژنومی را در برمی‌گیرد (۱۰-۸). پلی‌مورفیسم Glu298Asp در اگزون ۷ ژن eNOS قرار دارد و یکی از شایع‌ترین چند شکلی‌های این ژن است. نوکلئوتید گوانین (G) در موقعیت ۸۹۴ جایگزین تیمین (T) می‌شود که درنتیجه گلوتامیک اسید در کدون ۲۹۸ به آسپارتیک اسید تبدیل می‌شود. پلی‌مورفیسم rs11771443 دارای دو آلل C و T است که در پروموتر این ژن قرار دارد. در پلی‌مورفیسم VNTR اینترون ۴، ۲۷ جفت باز به اینترون ۴ اضافه یا حذف می‌شود. آلل غالب b است (طول اینترون ۴۲۰bp) و در صورت حذف این توالی ۲۷bp، آلل a بروز پیدا می‌کند (طول آلل a، ۳۲۰bp) است (۱۱،۶).

در سال‌های اخیر توجه زیادی به بررسی ارتباط بین چند شکلی‌های ژن eNOS (rs11771443، rs1799983 و VNTR اینترون ۴) با سقط مکرر شده است. از آنجا که نتایج واحدی از این مطالعات حاصل نشده است، لذا مطالعه‌ی این عوامل و ارتباط آن‌ها با سقط مکرر جنین، همچنان یکی از موضوعات مورد علاقه پژوهشگران است. در مطالعه‌ی حاضر ارتباط سه پلی‌مورفیسم مذکور در ژن نیتریک اکسید سنتاز با سقط مکرر بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مورد- شاهدی، ۸۰ خانم مبتلا به سقط مکرر جنین با میانگین و انحراف معیار سن ۵/۰۳±۲۷/۷ سال که حداقل ۲ یا تعداد بیشتری سقط قبل از هفته‌ی بیستم بارداری داشته و فاقد مشکلات آناتومیکی رحم، مشکلات ژنتیکی، مشکلات ایمونولوژیک، مشکلات هورمونی و مشکلات عفونی بوده‌اند، به عنوان گروه بیمار انتخاب شدند. این زنان در طی سال‌های ۱۳۸۹ الی ۱۳۹۳ به آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران مراجعه کرده بودند. در مقابل، ۸۰ خانم با حداقل ۲ تولد موفق بدون هیچ سابقه‌ای از سقط، به عنوان شاهد انتخاب شدند. میانگین و انحراف معیار سن این افراد ۴/۶۶±۳۰ سال بود.

پس از دادن آگاهی و کسب رضایت‌نامه، ۵ میلی‌لیتر خون محیطی از افراد بیمار و شاهد در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد. استخراج DNA ژنومیک از لکوسیت‌های خون محیطی، با استفاده ازروش نمک اشباع انجام شد. واکنش زنجیره‌ی پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای هر چند شکلی انجام گرفت (توالی پرایمرها در جدول ۱ ارایه شده است). واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۵۰ نانوگرم DNA ژنومیک، 1XPCR Buffer، ۰/۲۵ میلی مولار از هر dNTPs، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۳ پیکو مول از هر پرایمر و ۱ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (سیناژن، ایران) صورت گرفت. تکثیر در ۳۰ سیکل، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۶۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه انجام شد. دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. جهت تعیین ژنوتیپ پلی‌مورفیسم‌های rs11771443 و rs1799983، محصول PCR مربوطه به ترتیب با استفاده از آنزیم‌های محدوداثر *Mnl*I و *Ban*II مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. محصول PCR

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

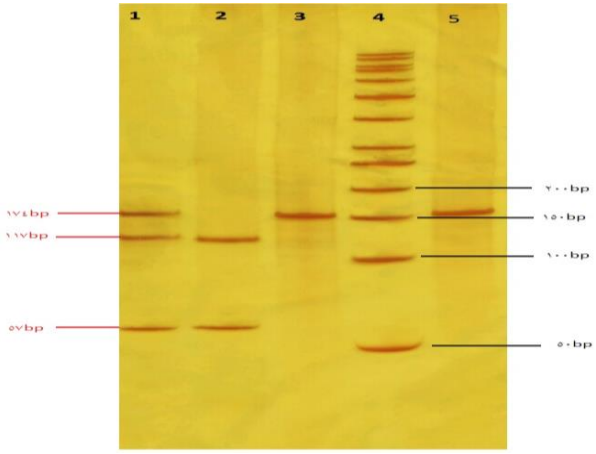
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول محصول PCR جهت بررسی چند شکلی‌های rs11771443، rs1799983 و VNTR اینترون ۴.

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول
Rs11771443- F Rs11771443-R	5 ′-CACAATGCCAGGCTCACACC-3 ′ 5 ′-TTGCTGGGAACATTTATATCTGAG-3 ′	174bp
Rs1799983-F RS1799983-R	5 ′- CAGGAAACGGTCGCTTCGAC -3 ′ 5 ′- CAGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC -3 ′	138bp
VNTR intron 4-F VNTR intron 4-R	5 ′- AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT -3 ′ 5 ′- TCTCTTAGTGCTGTGGTGAC -3 ′	420bp

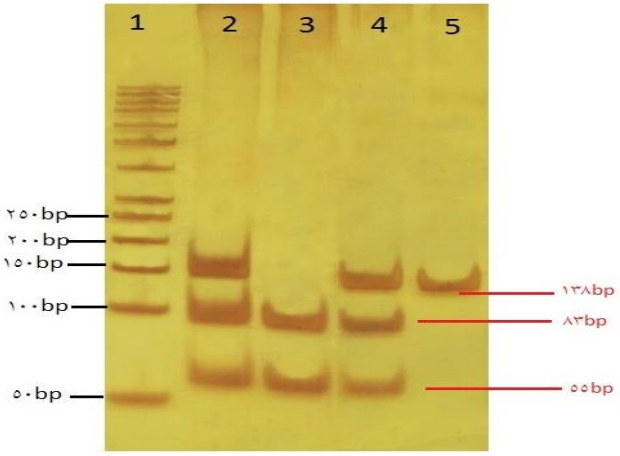
جهت بررسی چند شکلی rs11771443، طولی معادل ۱۷۴ جفت باز داشت. برش آنزیمی با *Mnl*I در ژنوتیپ CC، دو قطعه ۱۱۷ و ۵۷ جفت بازی ایجاد نمود. درحالی‌که آنزیم بر آلل T مؤثر نبوده و تنها یک باند ۱۷۴ جفت بازی روی ژل مشاهده گردید (شکل ۱).

طول محصول PCR پلی‌مورفیسم rs1799983، ۱۳۸ جفت باز بود. در افراد دارای ژنوتیپ TT در صورت تیمار با آنزیم *Ban*II هیچ برشی ایجاد نمی‌شود و تنها یک باند ۱۳۸ جفت بازی ایجاد می‌کند؛ ولی در ژنوتیپ GG، قطعه ۱۳۸ جفت بازی به دو قطعه ۵۵ و ۸۳ جفت بازی شکسته می‌شود (شکل۲). محصولات هضم آنزیمی، با الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۲٪، از هم تفکیک شده و پس از رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، نتایج بررسی گردید.

مشاهدات وارد نرم افزار SPSS (نسخه ۱۸) شد و توزیع ژنوتیپ‌های هر جهش، فراوانی هموزیگوت و هتروزیگوت‌ها در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از مربع کای پیرسون و تست دقیق فیشر مورد سنجش قرار گرفت. *p*-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.



شکل ۱. هضم آنزیمی قطعه rs11771443 با آنزیم *MnlI*. چاهک شماره ۴: مارکر اندازه گیری (۵۰bp)، چاهک شماره ۱: هتروزیگوتCT، چاهک شماره ۲: هموزیگوت CC، چاهک شماره ۳ و ۵: هموزیگوت TT.



شکل ۲. هضم آنزیمی قطعه 894 G>T با آنزیم *Ban*II. چاهک شماره ۱. مارکر اندازه‌گیری (۵۰ جفت بازی)، چاهک شماره ۲ و ۴: هتروزیگوت GT، چاهک شماره ۳: هموزیگوت GG، چاهک شماره ۵: هموزیگوت TT.

یافته‌ها

در این مطالعه فراوانی چند شکلی‌های rs11771443، rs1799983 و VNTR اینترون ۴ در ۸۰ خانم با سابقه‌ی سقط مکرر و ۸۰ خانم به عنوان شاهد با روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. فراوانی ژنوتیپی و آللی چند شکلی rs11771443 در جدول ۲ ارایه شده است. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده در گروه بیمار و شاهد به ترتیب ۴۸٪ در مقابل ۵۷٪ برای ژنوتیپ CC، ۳۸٪ در مقابل ۳۶٪ برای ژنوتیپ CT و ۱۳٪ در مقابل ۷٪ برای ژنوتیپ TT بود. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده برای این پلی‌مورفیسم در گروه بیمار و شاهد، ارتباط معنی‌داری را با سندرم سقط مکرر نشان نداد (*p*=۰/۱۶).

فراوانی ژنوتیپی پلی‌مورفیسم rs1799983 در زنان دارای سندرم سقط مکرر و زنان گروه شاهد، به ترتیب ۴۸٪ در مقابل ۶۰٪ برای ژنوتیپ GG، ۴۵٪ در مقابل ۳۵٪ برای ژنوتیپ GT و ۷٪ در مقابل ۵٪ برای ژنوتیپ TT بود. فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده برای این پلی‌مورفیسم در گروه بیمار و

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

شاهد، ارتباط معنی‌داری را با سندرم سقط مکرر نشان نداد (p=۰/۱۵؛ جدول ۳). فراوانی ژنوتیپی چند شکلی VNTR اینترون ۴ در جدول ۴ ارایه شده است. فراوانی ژنوتیپی bb در گروه بیمار ۷۲٪ و در گروه شاهد ۶۶٪ ، فراوانی ژنوتیپی aa در گروه بیمار و شاهد ۶٪ و فراوانی ژنوتیپی ab در گروه بیمار ۲۱٪ و در گروه شاهد ۲۹٪ بود. همچنین نتایج آنالیز آماری آزمون کای ارتباط معنی‌داری با سندرم سقط مکرر در جمعیت بیمار و شاهد نشان نداد (p=۰/۴۸).

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی، آللی و بررسی سطح معنی‌داری برای چند شکلی rs11771443 در گروه بیمار و شاهد.

آلل	فراوانی آلل در گروه شاهد		فراوانی آلل در گروه بیمار		فراوانی آلل در کل افراد مطالعه شده			
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
C	٪۷۵	۱۲۱	٪۶۷	۱۲۰	٪۷۱	۲۴۱		
T	٪۲۵	۴۱	٪۳۳	۵۸	٪۲۹	۹۹		
ژنوتیپ	**فراوانی ژنوتیپ در گروه شاهد**		**فراوانی ژنوتیپ در گروه بیمار**		**فراوانی ژنوتیپ در کل افراد مطالعه شده**		OR(95%CI)	p-value
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
CC	٪۵۷	۴۶	٪۴۸	۴۳	٪۵۲	۸۹	۰/۷۲(۰/۴۶-۱/۱۴)	۰/۱۶
CT	٪۳۶	۲۹	٪۳۸	۳۴	٪۳۷	۶۳		
TT	٪۷	۶	٪۱۳	۱۲	٪۱۱	۱۸		

جدول ۳. فراوانی ژنوتیپی، آللی و بررسی سطح معنی‌داری برای چند شکلی rs1799983 در گروه بیمار و شاهد.

آلل	فراوانی آلل در گروه شاهد		فراوانی آلل در گروه بیمار		فراوانی آلل در کل افراد مطالعه شده			
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
G	٪۷۸	۱۲۴	٪۷۱	۱۲۳	٪۷۴	۲۴۷		
T	٪۲۲	۳۶	٪۲۹	۵۱	٪۲۶	۸۷		
ژنوتیپ	**فراوانی ژنوتیپ در گروه شاهد**		**فراوانی ژنوتیپ در گروه بیمار**		**فراوانی ژنوتیپ در کل افراد مطالعه شده**		OR(95%CI)	p-value
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
GG	٪۶۰	۴۸	٪۴۸	۴۲	٪۵۴	۹۰	۰/۶۹(۰/۴۱-۱/۱۴)	۰/۱۵
GT	٪۳۵	۲۸	٪۴۵	۳۹	٪۴۰	۶۷		
TT	٪۵	۴	٪۷	۶	٪۶	۱۰		

جدول ۴. فراوانی ژنوتیپی، آللی و بررسی سطح معنی‌داری برای چند شکلی VNTR اینترون ۴ در گروه بیمار و شاهد.

آلل	فراوانی آلل در گروه شاهد		فراوانی آلل در گروه بیمار		فراوانی آلل در کل افراد مطالعه شده			
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
b	٪۸۰	۱۳۹	٪۸۳	۱۳۳	٪۸۱	۲۷۲		
a	٪۲۰	۳۵	٪۱۷	۲۷	٪۱۹	۶۲		
ژنوتیپ	**فراوانی ژنوتیپ در گروه شاهد**		**فراوانی ژنوتیپ در گروه بیمار**		**فراوانی ژنوتیپ در کل افراد مطالعه شده**		OR(95%CI)	p-value
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد		
aa	٪۶	۵	٪۶	۵	٪۶	۱۰	۱/۲۰(۰/۷۲-۲/۰۱)	۰/۴۸
ab	٪۲۹	۲۵	٪۲۱	۱۷	٪۲۵	۴۲		
bb	٪۶۶	۵۷	٪۷۲	۵۸	٪۶۹	۱۱۵		

بحث

نیتریک اکسید سنتاز اندوتلیالی با تنظیم انقباض عروق، کاهش فشار خون، شل‌کنندگی عضلات صاف و ایجاد لانه‌گزینی موفق نقش مؤثری در حفظ بارداری دارد. مطالعات متعددی در مورد ارتباط چند شکلی‌های ژن eNOS با سقط مکرر انجام شده است. از آنجا که نتایج واحدی از این مطالعات حاصل نشده است، لذا مطالعه این ژن و ارتباط آن با سقط مکرر جنین، یکی از موضوعات مورد علاقه‌ی پژوهشگران می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر توزیع فراوانی ژنوتیپ‌ها و آلل‌های پلی‌مورفیسم rs1799983 بین زنان گروه کنترل و گروه بیمار اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. در این SNP گلوتامیک اسید در کدون ۲۹۸ به آسپارتیک اسید تبدیل می‌شود. این تعویض اسیدآمینه با کاهش eNOS و در نتیجه کاهش NO همراه بوده و به نوبه‌ی خود باعث کاهش گشادسازی شریان برکیالی در دوران بارداری و اختلال در گردش خون مادر و جنین می‌شود (۶،۱۱،۱۲).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

در این تحقیق فراوانی ژنوتیپی گروه بیمار و شاهد در افرادی که حامل آلل موتاسیون یافته T هستند نزدیک به هم می‌باشد. این یافته حاکی از این امر است که دارا بودن این آلل در افراد بیمار هیچ ارتباطی با افزایش ریسک خطر ندارد. در سال ۲۰۰۶، Suryanarayana و همکاران مطالعاتی جهت بررسی ارتباط بین سقط مکرر و پلی‌مورفیسم 894 G>T اگزون ۷ ژن eNOS در میان ۱۴۵ زن با سابقه سقط مکرر در جنوب هند انجام دادند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ GT و TT در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل بود اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P_{GT}=۰/۴۳۵، P_{TT}=۰/۴۸۲). همچنین مطالعاتی که توسط Karvela (۲۰۰۸، یونان)، Zammiti (۲۰۰۷، تونس) و Fan (۲۰۰۷، چین) انجام گرفت، همانند تحقیق فوق ارتباط میان این پلی‌مورفیسم و سندرم سقط مکرر جنین را رد کرده است (۱۵-۱۳). این در حالی است که در برخی مطالعات دیگر نظیر Luo (۲۰۱۳، چین)، Öztürk (۲۰۱۱، ترکیه) و Shin (۲۰۱۰، کره) ارتباط این پلی‌مورفیسم با سقط مکرر جنین تأیید شده است (۱۸-۱۶).

در این تحقیق، فراوانی ژنوتیپ GT در افراد بیمار با فرکانس ژنوتیپی این ژنوتیپ در افراد بیمار در مطالعات Karvela در یونان برابر بوده و از سایر جمعیت‌های بیمار مربوط به Luo در چین، Suryanarayana در جنوب هند و Zammiti در تونس بیشتر است. کم‌ترین فرکانس ژنوتیپی ژنوتیپ TT در بیمار در چین و بیش‌ترین فرکانس آن در افراد مبتلا به سقط مکرر یونان می‌باشد (۲۲-۱۹).

پلی‌مورفیسم rs11771443 یکی دیگر از پلی‌مورفیسم‌های ژن eNOS است. ارتباط این پلی‌مورفیسم با سندرم سقط مکرر تنها توسط Luo (۲۰۱۳، چین) مورد مطالعه قرار گرفته است. Luo بیان داشت که این پلی‌مورفیسم به واسطه تنظیم رونویسی eNOS نقش بحرانی در سقط ایفا می‌کند. در مطالعات وی، فرکانس ژنوتیپی CC در افراد بیمار بیش از افراد کنترل است که عکس نتیجه تحقیق حاضر بوده و حاکی از آن است که فرکانس ژنوتیپی rs11771443 تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل دارد (۲۴،۲۳)، درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر اختلاف معنی‌داری در پلی‌مورفیسم جایگاه rs11771443 بین افراد دارای سابقه‌ی سقط مکرر و افراد کنترل مشاهده نشد که نشان‌دهنده‌ی عدم ارتباط معنی‌دار میان پلی‌مورفیسم مذکور و ریسک سقط مکرر در جمعیت مورد مطالعه است.

در مطالعات متعددی به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم VNTR اینترون ۴ با سندرم سقط مکرر انجام شده است. Tempfer و همکاران (۲۰۰۱) در اتریش مشاهده کردند که فراوانی ژنوتیپی ab در گروه بیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری دارد (p=۰/۰۳). همچنین مطالعات آن‌ها نشان داد، در افرادی که برای این پلی‌مورفیسم هتروزیگوت هستند خطر سقط ۱/۶ برابر گروه کنترل است (OR:۱/۶) (۱۳). نتایج مطالعات فن و همکاران (۲۰۰۷) در چین نشان داد که فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت aa و ab و همچنین آلل a در گروه بیمار بالاتر از گروه کنترل بوده و در افرادی که دارای ژنوتیپ aa و ab هستند خطر سقط ۱/۸ برابر گروه کنترل است (OR:۱/۸) (۱۶). به نظر می‌رسد در حاملین ab ، سطح سرمی NO کاهش یافته و این افراد را در معرض خطر اختلال در خون‌رسانی به جفت و انفارکتوس قرار دهد. برخی محققین گزارش کرده‌اند که حاملین این نوع پلی‌مورفیسم سطح سرمی NO کمی دارند و بیان پروتئین در آن‌ها کاهش می‌یابد (۱۵-۱۳). مطالعاتی که توسط Öztürk (۲۰۱۱)، Shin (۲۰۱۰) و Suryanarayana (۲۰۰۶) انجام گرفت، ارتباط معنی‌دار بین این پلی‌مورفیسم و سندرم سقط مکرر را رد کردند (۲۲،۲۱،۱۷). در تحقیقاتی که زامیتی و همکاران (۲۰۰۷) انجام دادند به این نتایج رسیدند که ژنوتیپ ab و aa در گروه بیمار بیش از گروه کنترل است اما از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (Pab=۰/۲۶، Paa=۰/۳۵) (۲۳). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که چند شکلی VNTR اینترون ۴ نیز همانند دو پلی‌مورفیسم دیگر با سقط مکرر در ارتباط نیست.

در این تحقیق فراوانی ژنوتیپی گروه بیمار و شاهد در افرادی که حامل ژنوتیپ aa هستند برابر و در افرادی که حامل ژنوتیپ ab هستند نزدیک به هم است. این یافته می‌تواند حاکی از این امر باشد که در مطالعه حاضر دارا بودن آلل a در افراد بیمار هیچ ارتباطی با افزایش ریسک خطر ندارد. بیش‌ترین فرکانس ژنوتیپی ژنوتیپ aa در افراد بیمار مربوط به Zammiti در تونس می‌باشد که تقریباً با فرکانس ژنوتیپی aa در گروه بیمار و شاهد در تحقیق حاضر برابر است. بیش‌ترین فرکانس ژنوتیپی ژنوتیپ ab در افراد کنترل مربوط به Suryanarayana در جنوب هند است. نتایج در تحقیق حاضر نشان می‌دهد که فراوانی ژنوتیپی ab در گروه کنترل جمعیت حاضر و جنوب هند تقریباً مساوی است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین پلی‌مورفیسم‌های مورد بررسی با سندرم سقط مکرر در جامعه آماری منتخب وجود نداشت. علت آن می‌تواند متفاوت بودن پراکنش آللی در

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

جمعیت‌های مختلف و یا فراوانی پایین برخی از آلل‌ها در جمعیت مورد مطالعه باشد. علاوه بر این ایران کشوری است که اقوام مختلفی را در خود جای داده و هر قوم می‌تواند فرکانس آللی مخصوصی را داشته باشد که در نتایج تأثیرگذار باشد. سومین عامل مؤثر در توجیه نتایج متناقض در جوامع مختلف رژیم غذایی است. چرا که مواد غذایی همچون کلم‌پیچ، اسفناج و شکلات تلخ حاوی فلاوونوئید بوده و به‌نوبه‌ی خود باعث تولید NO و گشاد شدن عروق می‌شوند.

در نهایت، SNP ها یک استعداد ژنتیکی برای فرد ایجاد می‌کنند که بروز این استعداد به زمینه‌ی ژنتیکی فرد و برهم‌کنش سایر ژن‌ها روی یکدیگر و همچنین محیط روی ژن‌ها بستگی دارد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی با افزایش جامعه‌ی آماری، سایر ژن‌ها و ارتباط متقابل آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات پرسنل آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران- دکتر اکبری به جهت همکاری صمیمانه در اجرای این طرح، تشکر و قدردانی می‌گردد. این پروژه با حمایت مالی آزمایشگاه ژنتیک پزشکی تهران، با شماره گرانت ۹۳۰۰۱ انجام شد.

REFERENCES

1. Tang AW, Quenby S. Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss. Curr Opin Obstet Gynecol 2010;4(46):45-49.

2. Emad M, Fadel A. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphism, nitric oxide and progesterone levels in unexplained recurrent pregnancy loss. Int J Chem Life Sci 2013;2(3):1126-1131.

3. Tarek A, Abd Elzaher A. Natural killer cells, macrophages and inflammatory chemokines in recurrent pregnancy loss: Life Sci J 2014;11(2):34-39.

4. Almawi WY, Guarino BD, Racoubian E, Finan RR. Endothelial Nitric Oxide Synthase gene variants and haplotypes associated with an increased risk of idiopathic recurrent miscarriage. Hum Fertil 2013;16(3):200-206.

5. Branch DW, Gibson M, Silver R, Clinical practice: Recurrent miscarriage. N Engl J Med 2010;36(3):1740-1747.

6. Colomba D, Duro G, Corrao S, Argano C, Di Chiara T, Nuzzo D, *et al*. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular damage in hypertensive subjects: an Italian case-control study. Immun Ageing 2008; 5(4):1742-4933.

7. Moshage H. Nitric oxide determinations: Much about no-thing? Clin Chem 1997;43(4):553-555.

8. Kone BC. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. Cardiovasc Res 2001;51(3):429-441.

9. Suryanarayana V, Rao L, Kanakavalli M, Padmalatha V, Deenadayal M, Singh L. Recurrent early pregnancy loss and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms. Arch Gynecol Obstet 2006;274(2):119-124.

10. Casas JP, Cavalleri GL, Bautista LE, Smeeth L, Steve E, Humphries SE, *et al*. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease. Am J Epidemiol 2006;164(10):921- 935.

11. Hingorani AD. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and atherogenesis. Atherosclerosis 2001;154(3): 521-527.

12. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, *et al*. Genotype dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. DNA Cell Biol 2005; 24(4):218-224.

13. Tempfer C, Unfried G, Zeillinger R, Hefler L, Nagele F, Huber JC. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism in women with idiopathic recurrent miscarriage. Hum Reprod 2001;16(8):1644-1647.

14. Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, HisanoriMinakami H. Genetic factors in fetal growth restriction and miscarriage. Semin Thromb Hemost 2005;31(3):334-345.

15. Ledingham MA, Thomson AJ, Young A, Macara LM, Greer IA, Norman JE. Changes in the expression of nitric oxide synthase in the human uterine cervix during pregnancy and parturition. Mol Hum Reprod 2000;6(11):1041-1048.

16. Fan W, Li SW, Wang Y. Association of genetic polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase 3 gene with recurrent early spontaneous abortion. Chin J Med Genet 2007;24(1):23-26.

17. Öztürk E. Nitric oxide levels and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Turkish women with idiopathic recurrent miscarriage. The Turkish-German Gynecological Education and Research Foundation; 2011.

18. Fábregues F, Balasch J, Manau D, Creus M, Jiménez W, Carmona F, *et al*. Circulating levels of nitric oxide in successful and unsuccessful implantation after in vitro fertilization and embryo transfer. Relat Estradiol Progesterone 2000;79(7):564-569.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]

19. Parveen F, Faridi RM, Alam S, Agrawal S. Genetic analysis of eNOS gene polymorphisms in association with recurrent miscarriage among north Indian women. Reprod Bio Med Online 2011;23(1):124-131.

20. Hefler L, Termpfer C, Bashford MT, Unfried G, Zeillinger R, Scheeberger C, *et al*. Polymorphisms of the angiotensinogen gene, the endothelial nitric Oxide synthase gene, and the Interleukine-1beta gene promoter in women with idiopathic recurrent miscarriage. Mol Hum Reprod 2002;8(1):95-100.

21. Shin SJ, Lee HH, Cha SH, Kim JH, Shim SH, Choi DH, *et al*. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 4a4b, 894G>T) and haplotypes in Korean patients with recurrent spontaneous abortion. Eur J Obstet Gynceol Reprod Biol 2010;152(1):64-6.

22. Karvela M, Papadopoulou S, Tsaliki E, Konstantakou E, Hatzaki A, Florentin-Arar L, *et al*. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions. Arch Gynecol Obstet 2008;278(4):349-352.

23. Zammiti W, Mtiraoui N, Mahjoub T. Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in Tunisian women. Am J Reprod Immun 2008; 59(2):139-145.

24. Luo L, Li DH, Wei SG, Zhang HB, Li SB, Zhao J. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene associated with recurrent miscarriage. Genet Mol Res 2013;12(3):3879-3886.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2025-07-13]