مقاله پژوهشی

ارتباط پلی‌مورفیسم C677T ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز با میزان هموسیستئین در زنان مبتلا به ناباروری اولیه و ثانویه در استان اصفهان

الهام سادات سنبلستان[۱]، حسین سازگار[۱*]، نوشا ضیاء جهرمی[۱]، فرزانه محمدی فارسانی[۱و۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- گروه ژنتیک، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز به‌عنوان یکی از عوامل ژنتیکی مؤثر بر ناباروری، آنزیم متیل هیدروفولات ردوکتاز را کد می‌کند که عملکرد آن کمک به تنظیم سطح هموسیستئین در بدن است. جهش در ژن کد کننده این آنزیم سبب کاهش فعالیت آن می‌گردد که این امر نیز به‌نوبه‌ی خود منجر به افزایش سطح هموسیستئین خون شده و می‌تواند باعث ایجاد ناباروری شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم C677T ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز با ناباروری است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد_شاهدی بر روی ۱۰۰ نمونه از زنان نابارور و یا بارور باسابقه‌ی سقط و ۱۰۰ نمونه زن باردار سالم انجام گرفت. بعد از استخراج DNA از خون محیطی، تعیین ژنوتیپ به‌وسیله‌ی روش PCR-RFLP انجام شد. جهت بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم و زنان نابارور از نرم‌افزار SPSS (با کمک آزمون t، آزمون خی- دو و رگرسیون لجستیک) استفاده گردید.

نتایج: پلی‌مورفیسم C677T ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز، باعث افزایش معنادار سطح هموسیستئین و کاهش سطح اسیدفولیک و ویتامین B12 در افراد هموزیگوت می‌گردد ولی ارتباط معناداری بین افراد هتروزیگوت، تغییر سطح هموسیستئین، اسیدفولیک و ویتامین B12 وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: وجود پلی‌مورفیسم C677T ژن MTHFR می‌تواند با افزایش سطح هموسیتئین و همچنین کاهش سطح اسیدفولیک و ویتامین موجب ایجاد سندرم سقط مکرر جنین‌گردد.

کلمات کلیدی: ژن متیلن تتراهیدروفولات ردوکتاز، ناباروری، پلی‌مورفیسم، هموسیستئین، چندشکلی قطعات برش یافته (RFLP)

مقدمه

ناباروری به ناتوانی یک زوج در باردارشدن پس از یک سال رابطه جنسی بدون پیشگیری از بارداری، گفته می‌شود که معضلات زیادی در خانواده و جامعه ایجاد می‌کند (۱). حدود ۶۰ تا ۸۰ میلیون از زوج‌ها در سراسر جهان از ناباروری رنج می‌برند و این آمار همچنان در حال افزایش است (۲). تقریباً سه میلیون نفر از جمعیت کشور ایران با مشکل ناباروری مواجه هستند، در استان اصفهان ۱۷ درصد از زوج‌های جوان نابارور هستند (۳). ناباروری به دو شکل اولیه و ثانویه ممکن است بروز کند. اصطلاح ناباروری اولیه در مورد بیمارانی به کار می‌رود که سابقه حاملگی ندارند ولی در مقابل، بیماران مبتلا به ناباروری ثانویه زوج‌هایی هستند که در گذشته حداقل یک‌بار حامله (هرچند موفقیت‌آمیز نبوده) شده‌اند و بعدازآن دیگر باردار نشده‌اند (۴).

ناباروری علل متفاوتی دارد. حدود ۱۵-۱۰ درصد از زوج‌ها درگیر آن است. تخمین زده می‌شود که حدود ۴۰-۳۰ درصد

*نویسنده مسئول: **حسین سازگار**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
Email:hoseinsazgar@yahoo.com

ناباروری به عوامل مردانه و حدود ۵۰-۴۰ درصد به عوامل زنانه مربوط است و در اغلب موارد یک علت ژنتیکی وجود دارد. در مردان علت ناباروری وابسته به مشکلات تولید اسپرم و یا انتقال آن است. تولید اسپرم ممکن است تحت تأثیر علل هورمونی، بیماری‌های مزمن، جراحی قلب، بیماری‌های دوران کودکی، فاکتورهای محیطی و شیوه خاص زندگی قرار گیرد. دلایل دیگر ناباروری در مردان عبارت‌اند از: مسدود شدن مسیر اسپرم، مصرف مواد مخدر، ترومای ناحیه تناسلی، واریکوسل، اختلال در نعوذ، اختلال در تولید اسپرم و بیماری‌های مزمن است. در زنان علت ناباروری می‌تواند وابسته به اختلالات تخمک‌گذاری، انسداد لوله-های فالوپ به علت بیماری‌های التهابی، مشکلات مادرزادی که مشتمل بر اختلالات سیستم رحم و سرویکس باشد، سن بالای ۳۵ سال، اختلالات هیپوتالاسمی، غده هیپوفیز، آدرنال و تیروئید، سطح بالای هورمون پرولاکتین و یائسگی زودرس است. از میان این عوامل ذکرشده، مشکلات تخمک‌گذاری شایع‌ترین عامل بروز ناباروری در زنان شناخته شده است (۳).

هموسیستئین یک اسیدآمینه غیر پروتئینی است که از اسیدآمینه متیونین ایجاد می‌شود در این حالت متیونین عامل متیل خود را در واکنش‌های بیوشیمیایی از دست می‌دهد و خود تبدیل به هموسیستئین می‌شود. افزایش هموسیستئین معمولاً باعث سقط‌جنین‌های مکرر، پره اکلامپسی، ناباروری، سندرم داون و دیگر نگرانی‌های پیرامون بارداری می‌شود (۵). رنج نرمال هموسیستئین در سرم خون ۲/۳-۰/۵۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر است. درصورتی‌که این مقدار افزایش یابد برای زنان باردار بسیار خطرناک است. عواملی که باعث افزایش هموسیستئین می‌شود، میزان بالای فولیک اسید، پیرودوکسین و کوبالامین در رژیم غذایی، بیماری‌هایی نظیر کلیوی، آلزایمر، کم‌کاری تیروئید و سرطان‌های خاص، مصرف بیش‌ازحد الکل و عوامل ژنتیکی ازجمله جهش در ژن MTHFR را می‌توان ذکر کرد (۶).

ژن MTHFR روی کروموزوم ۱ و در موقعیت p36.3 قرار گرفته است. این ژن آنزیم متیل هیدروفولات ردوکتاز را کد می-کند که عملکرد آن کمک به تنظیم سطح هموسیستئین در بدن است (۷). C677T و A1298C مهم‌ترین پلی‌مورفیسمی است که از این ژن شناسایی شده است (۸). در پلی‌مورفیسم MTHFR C677T جایگزینی سیتوزین توسط تیمین (C> T) رخ می‌دهد که باعث تبدیل اسیدآمینه آلانین به والین می‌شود (۹). این ژن بر روی فاکتورهای انعقادی نیز تأثیر می‌گذارد، برای مثال می‌تواند فاکتور Leiden V را تحت تأثیر قرار دهد که در بیماران قلبی حائز اهمیت است. موتاسیون ژن MTHFR با افزایش شانس داشتن بچه‌ای با نقص لوله‌های عصبی ارتباط داشته است (۱۰). ژن MTHFR در برداشت اسیدفولیک و دیگر شکل‌های فولات توسط سلول‌ها بسیار حیاتی است.

افراد دارای پلی‌مورفیسم در ژن MTHFR به نام C677T به میزان چهل تا شصت درصد برای تولید مؤثرترین شکل فولات به نام «متیل فولات» ناتوان هستند. میتل فولات ماده‌ی مغذی، حیاتی و مؤثر برای تولید ناقلان سیستم عصبی و سیستم قلبی و عروقی است. متیل فولات به شیوه‌ای غیرمستقیم بر میزان هورمون‌ها و سم‌زدایی بدن تأثیر می‌گذارد (۱۱). ژن MTHFR سبب ایجاد یک ترکیب حیاتی به نام اس- آدنوزین متیونین می-شود که عموماً بانام SAMe خوانده می‌شود. SAMe برای تولید CoQ10، کارنیتین و کراتین ضروری است. این ترکیبات برای کسانی پیشنهاد می‌شود که تحت درمان‌های ناباروری با روش-های پزشکی مکمل یا جایگزین قرار می‌گیرند. هموسیستئین محصولی اضافی پس از تولید SAMe است. متیل فولات در کنار متیل کوبالامین به تبدیل هموسیستئین به متیونین کمک می-کند. تا زمانی که ژن MTHFR طی عملکرد خود، متیل فولات تولید کند، این چرخه ادامه خواهد داشت (۱۲). اختلال ژنی MTHFR C677T به طرز چشمگیری باعث افزایش هموسیستئین می‌شود. با در نظر گرفتن نتایج خطرناک عملکرد ضعیف ژن MTHFR، کسانی که می‌خواهند بچه‌دار شوند، باید به‌طورجدی غربال‌گری برای ناهنجاری ژنتیکیMTHFR را در نظر داشته باشند (۱۱).

تاکنون مطالعات بسیاری در جهت بررسی نقش پلی‌مورفیسم ژن MTHFR مختلف انجام گرفته و نتایج متفاوتی حاصل گردیده است. به‌علاوه، با توجه به عدم بررسی ارتباط هموسیستئین و اسیدفولیک و ویتامین B12 با ژن MTHFR در ارتباط با ناباروری اولیه و ثانویه در استان اصفهان، در این راستا ما به بررسی نقش پلی‌مورفیسم C677T، در بیماران نابارور این استان پرداختیم.

مواد و روش ها

انتخاب گروه بیمار و گروه شاهد

در این مطالعه، تعداد ۱۰۰ فرد از زنان باروری که سابقه سقط و ناباروری اولیه داشتند و ۱۰۰ فرد از زنان باردار سالم به‌عنوان

کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور، حدود ۲/۵ میلی-لیتر از خون هر فرد، از بیمارستان بهشتی و مرکز ناباروری اصفهان، جمع‌آوری شد. اطلاعات مرتبط با علت سقط، داروهای مورد استفاده در افراد و فعالیت‌های آن‌ها نیز از طریق تهیه پرسشنامه موردبررسی قرار گرفت. قابل‌ذکر است که در این مطالعه توجه شد که سقط زنان مورد آزمایش به‌واسطه فعالیت ورزشی نباشد. همان‌گونه که اشاره شد، میزان حجم نمونه گرفته‌شده حدود ۲/۵ میلی‌لیتر خون بوده که پس از نمونه‌گیری، به‌صورت کامل با EDTA در لوله‌ها مخلوط شد. لوله حاوی خون، جهت سالم ماندن در کوتاه‌ترین زمان ممکن بر روی یخ به فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها با روش‌های علمی و اختصاصی، استخراج DNA با استفاده از کیت سینا ژن انجام گرفت و DNA استخراج‌شده جهت استفاده در مراحل بعد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین ژنوتیپ

به‌منظور تعیین ژنوتیپ افراد مورد بررسی از روش PCR-RFLP استفاده شد. پرایمرهای مورداستفاده برای انجام واکنش PCR، بر اساس توالی ژن MTHFR انسان طراحی و سنتز گردید. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ارائه شده است.

شرایط واکنش PCR و برنامه بهینه‌شده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

هضم آنزیمی محصول PCR با افزودن ۱۰ میکرولیتر از نمونه DNA (محصول PCR) به یک ویال ۰/۲ میکرولیتر استریل، یک میکرولیتر آنزیم Hinf1 (با غلظت ۱۰u/µl)، ۲ میکرولیتر بافر R (با غلظت X10) و به حجم ۲۰ میکرولیتر رساندن ویال توسط آب صورت پذیرفت. سپس ویال حاوی واکنش هضم آنزیمی به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت کامل گشتن هضم آنزیمی قرار گرفت و درنهایت محصولات هضم آنزیمی توسط الکتروفورز با ژل ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- مشخصات پرایمر

نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	طول محصول PCR
پرایمر پیشرو	5'- AGC TTT GAG GCT GAC CTG AAG-3'	۶۱/۷	۲۱۰bp
پرایمر معکوس	5'- AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'	۶۲/۲	

شرایط واکنش PCR و برنامه بهینه‌شده در این مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- مواد و مقدار موردنیاز برای انجام PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر

ماده	غلظت محلول	حجم مورداستفاده (µl)	غلظت نهایی در واکنش
آب		۱۷/۵	-
بافر PCR	۱۰X	۲/۵	۱X
$MgCl_2$	۵۰ میلی‌مولار	۰/۷۵	۱/۵ میلی‌مول بر لیتر
dNTP	۱۰ میلی‌مولار	۰/۵	۰/۲ میلی‌مول بر لیتر
پرایمر پیشرو	۱۰ میلی‌مولار	۱	۰/۴ میکرو مول بر لیتر
پرایمر معکوس	۱۰ میلی‌مولار	۱	۰/۴ میکرو مول بر لیتر
DNA ژنومی	۱ میکروگرم بر میکرولیتر	۱	۱ میکروگرم در مخلوط نهایی
Taq DNA Polymerase	۵ واحد بر میکرولیتر	۰/۲۵	۱ واحد در مخلوط نهایی

واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با برنامه PCR به‌صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل PCR شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت.

آنزیم Hinf1 قادر به شناسایی و برش توالی به‌صورت زیر است.

5'... G▼A N T C ...3'
3'...C T N A▲G ...5'

اندازه‌گیری هموسیستئین

اندازه‌گیری هموسیستئین به روش فتومتریک با دستگاه Mindry BS 800 انجام گرفت. در این روش پس از نمونه‌گیری ۲cc خون از بیمار و سانتریفیوژ کردن خون و جدا کردن سرم آن، ۳ لاندا سرم بیمار با ۱۰۰ لاندا محلول Reajent1 مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲۵ لاندا Reajent2 به مخلوط بالا اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. درنهایت میزان هموسیستئین در طول ۳۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری اسیدفولیک

اندازه‌گیری اسیدفولیک به روش الکترکمی لومینسانس با دستگاه Cobase 411 انجام گرفت. در این روش پس از نمونه-گیری ۲cc خون از بیمار و سانتریفیوژ کردن خون و جدا کردن سرم آن، ۲۰ لاندا سرم بیمار با ۲۰ لاندا محلول Reajent1 مخلوط شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. درنهایت تست به مدت ۵ دقیقه در طول ۳۸۰ نانومتر انجام شد و میزان اسیدفولیک خون اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری ویتامین B12

اندازه‌گیری ویتامین B12 به روش فتومتریک با دستگاه Mindry BS 800 انجام گرفت. در این روش پس از نمونه‌گیری ۲cc خون از بیمار و سانتریفیوژ کردن خون و جدا کردن سرم آن، ۲۰ لاندا سرم بیمار با ۲۰ لاندا محلول Reajent1 مخلوط شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. درنهایت تست به مدت ۵ دقیقه در طول ۳۸۰ نانومتر انجام شد و میزان اسیدفولیک خون اندازه‌گیری گردید.

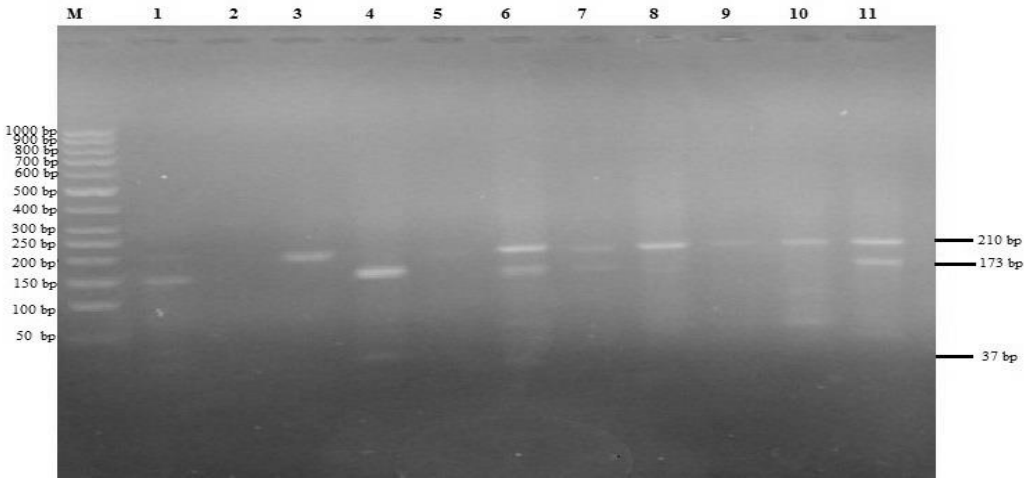
آنالیز آماری

جهت بررسی نسبت بیان ژن MTHFR و ارتباط این ژن با هموسیستئین، اسیدفولیک و ویتامین B12 و همچنین ارتباط این موارد با ناباروری و سقط‌جنین از روش‌های تحلیلی آماری (کای دو X و رگرسیون لجستیک) به‌وسیله نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۲، OR با اطمینان کمتر از ۰/۰۵ درصد محاسبه شد به‌منظور بررسی اختلاف میان توزیع ژنوتیپی و فراوانی آللی در گروه‌های مختلف افراد بیمار و کنترل در تحقیق حاضر نسبت احتمال بافاصله اطمینان ۹۵ درصد برای تخمین ارتباط میان پلی-مورفیسم در ژن و خطر ابتلا به ناباروری مردان، مورداستفاده قرار گرفت.

برای این نمونه خاص در افراد هتروزیگوت و هموزیگوت میزان هموسیستئین از رنج نرمال (۱۷-۵) بالاتر است، میزان اسیدفولیک در این نمونه‌های خاص کمتر از رنج نرمال (۱۷/۷-۴/۱۳) کم‌تر است و میزان ویتامین B12 در این نمونه خاص کمتر از رنج نرمال (۶۶۳-۱۹۱) است.

نتایج

برای مشخص نمودن ژنوتیپ افراد موردبررسی، محصولات حاصل از PCR هر نمونه با استفاده از آنزیم Hinf1 برش داده شد. نتایج نشان داد در افراد سالم جایگاهی برای برش آنزیمی

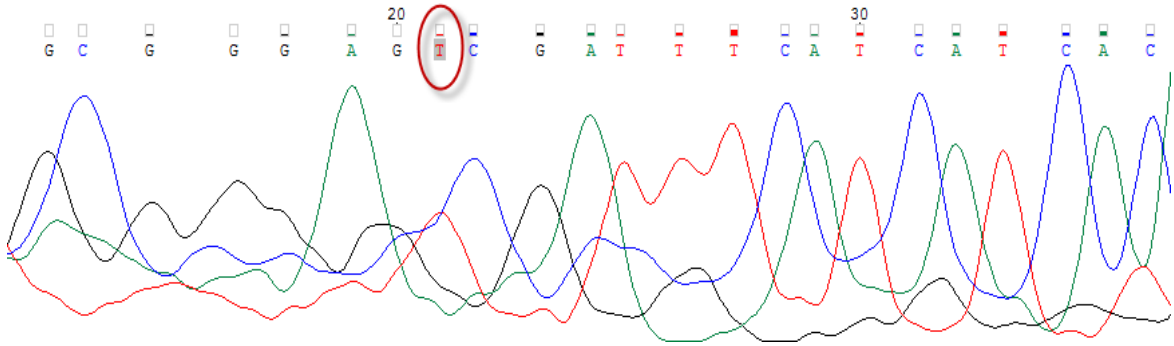


شکل ۱- محصولات PCR-RFLP. در این تصویر، چاهک‌های ۱ و ۴ مربوط به افراد هموزیگوت، چاهک‌های ۶، ۷ و ۱۱ مربوط به افراد هتروزیگوت و چاهک‌های ۳، ۸، ۹ و ۱۰ مربوط به افراد سالم می‌باشند.

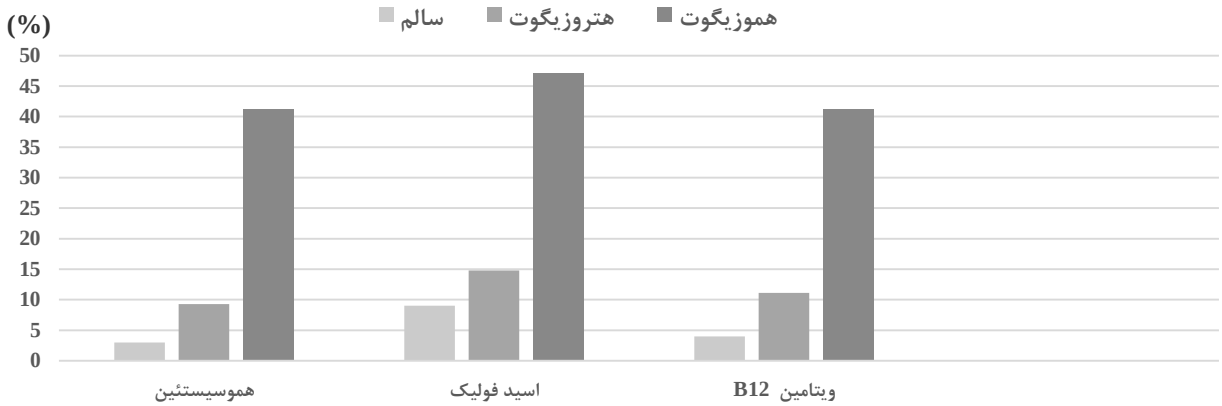
وجود ندارد و بنابراین DNA دست‌نخورده و با طول ۲۱۰ جفت باز باقی می‌ماند درحالی‌که از افراد هموزیگوت بیمار باندهایی به طول ۳۷ و ۱۷۳ جفت باز و از افراد هتروزیگوت سالم باندهایی به طول ۳۷، ۱۷۳، ۲۱۰ جفت باز ایجاد می‌کند (شکل ۱). همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود چاهک‌های ۱ و ۴ مربوط به افراد هموزیگوت، چاهک‌های ۶، ۷ و ۱۱ مربوط به افراد هتروزیگوت و چاهک‌های ۳، ۸، ۹ و ۱۰ مربوط به افراد سالم می‌باشند. به‌منظور تائید نتایج حاصل از RFLP، از روش تعیین توالی ژنومی استفاده شد. نتایج حاصل از این تعیین توالی برای فرد هموزیگوت بیمار در شکل ۲ نشان داده شده است. در این تصویر محل تغییر نوکلئوتیدی با دایره قرمزرنگ نشان داده شده است. حضور جهش در این توالی با استفاده از ابزار BLAT در سایت NCBI Search Result مورد تائید قرار گرفت.

همان‌گونه که در نمودار ۱ قابل مشاهده است، نتایج بررسی بیان می‌کند که از ۱۰۰ نمونه خون زنانی که سقط مکرر داشتند ۵۴ نمونه هتروزیگوت، ۱۷ نمونه هموزیگوت و ۲۹ دارای ژنوتیپ طبیعی هستند. بررسی سطح هموسیستئین نشان می‌دهد که در گروه شاهد ۳ درصد، در افراد هتروزیگوت ۹/۲۶ درصد و نهایتاً ۴۱/۱۸ درصد از افراد هموزیگوت دارای هموسیستئین بالاتر از حد طبیعی بودند.

بررسی نتایج با استفاده از آزمون T-Student بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد در میزان هموسیستئین خون افراد هموزیگوت و سالم بود (T=۳/۲۵۳ و P-Value= ۰/۰۰۴). همچنین مقایسه سطح هموسیستئین در خون افراد سالم و هتروزیگوت بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح هموسیستئین خون آن‌ها بود (T=۰/۹۵۸ و P-Value= ۰/۳۴).



شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی ژن در فرد هموزیگوت بیمار. در این تصویر محل تغییر نوکلئوتیدی با دایره قرمزرنگ نشان داده شده است.



نمودار ۱- درصد افراد دارای فاکتورهای خونی غیرطبیعی

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون خی – دو نشان داد که ارتباط متقابلی بین افزایش سطح هموسیستئین در خون و هموزیگوت بودن فرد وجود دارد (χ2=۲۷/۰۹۲ و P-Value< ۰/۰۰۱). این در حالی است که ازلحاظ آماری در سطح اطمینان

۹۵ درصد ارتباطی بین هتروزیگوت بودن و افزایش سطح هموسیستئین در خون فرد وجود ندارد (χ2=۲/۷۸۹ و ۰/۰۹۵ =P-Value).

بررسی سطح ویتامین B12 نشان می‌دهد که در گروه شاهد ۴ درصد از افراد دارای B12 پایین‌تر از حد طبیعی بودند این در حالی است که در افراد هتروزیگوت این رقم به ۱۱/۱۱ درصد و نهایتاً ۴۱/۱۸ درصد از افراد هموزیگوت دارای B12 پایین‌تر از حد طبیعی بودند. بررسی نتایج با استفاده از آزمون T بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد در میزان ویتامین B12 خون افراد هموزیگوت و سالم بود (T= ۳/۶۶۶ و P- ۰/۰۰۱ >Value). همچنین مقایسه سطح ویتامین B12 در خون افراد سالم و هتروزیگوت بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ویتامین B12 خون آن‌ها بود (T=۱/۵۰۰ و P-Value=۰/۱۳۶).

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون خی – دو نشان داد که ارتباط متقابلی بین کاهش سطح ویتامین B12 در خون و هموزیگوت بودن فرد وجود دارد (χ2=۲۹/۲۶۸ و P- ۰/۰۰۱ >Value). این در حالی است که ازلحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارتباطی بین هتروزیگوت بودن و کاهش سطح ویتامین B12 در خون فرد وجود ندارد (χ2=۲/۹۲۰ و P- ۰/۰۸۷ =Value). بررسی سطح اسیدفولیک خون نشان می‌دهد که در گروه شاهد ۹ در صد از افراد دارای اسیدفولیک پایین از حد طبیعی بودند این در حالی است که در افراد هتروزیگوت این رقم به ۴۷/۰۶ درصد و نهایتاً ۱۴/۸۱ درصد از افراد هموزیگوت دارای اسیدفولیک پایین‌تر از حد طبیعی بودند. بررسی نتایج با استفاده از آزمون T بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد در میزان اسیدفولیک خون افراد هموزیگوت و سالم بود (T=۳/۴۵۲ و P-Value= ۰/۰۰۱).

همچنین مقایسه سطح اسیدفولیک در خون افراد سالم و هتروزیگوت بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح اسیدفولیک خون آن‌ها بود (T=۰/۳۹۱ و P-Value=۰/۶۹۷). بررسی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون خی – دو نشان داد که ارتباط متقابلی بین کاهش سطح اسیدفولیک در خون و هموزیگوت بودن فرد وجود دارد (χ2=۱۶/۹۴۷ و P-Value< ۰/۰۰۱).

این در حالی است که ازلحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارتباطی بین هتروزیگوت بودن و کاهش سطح اسیدفولیک در خون فرد وجود ندارد (χ2=۱/۲۰۷ و P-Value=۰/۲۷۲). ارتباطی بین هتروزیگوت بودن و کاهش سطح B12 در خون فرد وجود ندارد (χ2=۲/۹۲۰ و P-Value= ۰/۰۸۷).

رگرسیون لجستیک برای ارزیابی میزان تغییرات سه فاکتور پیش‌بین میزان هموسیستئین، ویتامین B12 و اسیدفولیک در افراد هتروزیگوت و هموزیگوت نسبت به افراد سالم اجرا شد. برای افراد هموزیگوت مدل کلی شامل همه پیش‌بینی‌ها به لحاظ آماری معنی‌دار بود (($N = ۱۱۷$, ۳) = ۲۲/۶۸۸ ^{2} □ , ۰/۰۰۱ > P-Value).

این نشان می‌دهد که این مدل می‌تواند افراد هموزیگوت و سالم را برحسب پیش‌بینی‌های ارائه‌شده تمیز دهد. این مدل می‌تواند بین ۱۷/۶ درصد (مجذور R کاکس و اسنل) و ۳۱/۳ درصد (مجذور R نگل کرک) از واریانس (چگونگی توزیع داده‌ها) را بر اساس متغیرهای پیش‌بین تفسیر کند و ۹۱/۵ درصد موردها را به‌درستی طبقه‌بندی نماید. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود پیش‌بینی سطح هموسیستئین خون دارای سهم معنادار در مدل است.

در هموزیگوت بودن قوی‌ترین پیش‌بینی سطح هموسیستئین خون با نسبت برتری ۰/۰۸۱۴ است که چون کمتر

جدول ۳- مدل رگرسیون لجستیک برای افراد هموزیگوت و سالم

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.for EXP(B)	
							Lower	Upper
اسیدفولیک	-۰/۷۶	۰/۱۶۸	۰/۲۰۵	۱	۰/۶۵۱	۰/۹۲۷	۰/۶۶۷	۱/۲۸۸
B12	۰/۰۰۸	۰/۰۰۶	۱/۸۷۷	۱	۰/۱۷۱	۱/۰۰۹	۰/۹۹۶	۱/۰۲۱
هموسیستئین	-۰/۲۰۵	۰/۰۷۸	۶/۸۵۳	۱	۰/۰۰۹	۰/۸۱۴	۰/۶۹۸	۰/۹۵۰
ثابت	۲/۳۳۴	۱/۵۸۳	۲/۱۷۴	۱	۰/۱۴۰	۱۰/۳۱۹		

از یک است نشان می‌دهد افراد هموزیگوت دارای افزایش سطح هموسیستئین در خون خود هستند. از طرف دیگر در سطح اطمینان ۹۵ درصد فاصله اطمینان OR برای جامعه بین ۰/۶۹۸ تا ۰/۹۵۰ است و چون این فاصله مقدار ۱ را شامل نمی‌شود می‌توان گفت که در سطح P-Value < ۰/۰۰۵ معنی‌دار است.

ارزیابی فاکتورهای پیش‌بین در مدل ارائه‌شده توسط رگرسیون لجستیک برای افراد هتروزیگوت نشان داد که مدل ارائه‌شده برای افراد هتروزیگوت دارای کیفیت عملکرد خوبی نبوده و شاخص «خوبی برازندگی» برای آن مطلوب نیست. در این مدل در تست برازندگی شاخص‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنادار نبود (۷/۲۶۳ = ((۳ , N =۱۵۴)) χ^2 , ۰/۰۶۴= P-Value). به‌علاوه مدل تنها ۶۶/۲ درصد از داده‌ها را به‌درستی طبقه‌بندی کرده بود. از طرف دیگر آزمون مدل بر مبنای آزمون هوسمر و لمشو در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنادار نبود (۵/۰۳۸ = ((۸ , N =۱۵۴)) χ^2 , ۰/۷۵۴= P-Value).

این نتایج نشان می‌دهد که نمی‌توان بر مبنای متغیرهای سطح هموسیستئین، ویتامین B12 و اسیدفولیک در خون مدلی را برای افراد هتروزیگوت به دست آورد. نتایج به‌دست‌آمده برای رگرسیون لجستیک افراد هتروزیگوت در توافق کامل با نتایج به‌دست‌آمده از آزمون خی دو است و بیان دارد که این فاکتورهای خونی تنها می‌توانند در افراد هموزیگوت به‌عنوان شاخص عمل نمایند و میزان آن‌ها در افراد هتروزیگوت نسبت به افراد عادی تفاوت معنی‌داری ازلحاظ آماری ندارد.

بحث و نتیجه گیری

مطالعات انجام‌شده بر روی جوامع مختلف، عوامل مختلفی را برای سندروم سقط مکرر جنین معرفی نموده‌اند که از میان این عوامل می‌توان کمبود فولات و پلی‌مورفیسم‌های ژن MTHFR اشاره کرد. در این مطالعات پلی‌مورفیسم‌های ژن MTHFR به‌عنوان عامل مهم در تخریب جفت در نظر گرفته می‌شوند این در حالی است که مطالعات دیگری حاکی از عدم ارتباط میان این پلی‌مورفیسم‌ها و سقط مکرر جنین است (۱۳، ۱۴).

در مطالعه انجام‌گرفته در این پژوهش، جهت رفع تضاد به وجود آمده در مطالعات قبلی و ازآنجایی‌که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در این زمینه در حیطه‌ی استان اصفهان صورت نگرفته بود، به بررسی اثر غیرمستقیم پلی‌مورفیسم C677T ژن MTHFR بر روی سندرم سقط مکرر جنین به‌واسطه سه فاکتور خونی هموسیستئین، اسیدفولیک و ویتامین B12 پرداخته شد.

نتایج حاصله نشان داد که وجود پلی‌مورفیسم C677T ژن MTHFR می‌تواند با افزایش سطح هموسیتئین ($\chi2$=۲۷/۰۹۲ و P-Value<۰/۰۰۱) و همچنین کاهش سطح اسیدفولیک ($\chi2$=۱۶/۹۴۷ و P-Value<۰/۰۰۱) و ویتامین B12 ($\chi2$=۲۹/۲۶۸ و P-Value<۰/ ۰۰۱) موجب ایجاد سندرم سقط مکرر جنین‌گردد. آنزیم Hinf1 در افراد هموزیگوت، ۳۰ درصد عملکرد و در افراد هتروزیگوت ۶۵ درصد عملکرد را در مقایسه با افراد نرمال دارد. این افراد به‌ویژه هموزیگوت‌های بیمار به‌شرط دریافت فولات کافی، دارای سطوح طبیعی هموسیستئین در خون خواهد بود ولی اگر فولات کافی دریافت نکند، میزان هموسیستئین در آن‌ها افزایش‌یافته و درخطر عواقب مربوط به افزایش هموسیستئین خون قرار گرفته است و لذا انجام تست تشخیصی برای ردیابی جهش و شروع اقدامات درمانی مناسب امری ضروری است. نمونه‌هایی که فقط دارای یک قله در یک ناحیه جهش‌یافته دیده شد یعنی هر دو ژن آن جهش‌یافته است و ازنظر MTHFRC677T مثبت است و هموزیگوت بیمار محسوب می‌گردد. درصورتی‌که نمونه دارای یک قله در ناحیه مربوط به ژن جهش‌یافته و یک قله در ناحیه مربوط به ژن سالم باشد، یعنی یکی از ژن‌های آن طبیعی و MTHFR دیگری معیوب است و ازنظر MTHFRC677T مثبت است و هتروزیگوت محسوب می‌گردد. درصورتی‌که نمونه فقط دارای یک قله در ناحیه مربوط به ژن سالم باشد، یعنی هر دو ژن آن طبیعی است و ازنظر MTHFRC677T منفی است و هموزیگوت سالم محسوب می‌گردد.

در این مطالعه در تعدادی از افراد هتروزیگوت علاوه بر جهش در موقعیت ژنی ۶۷۷ در موقعیت ژنی ۶۸۹ جهش دیده شده است که پیشنهاد می‌شود ارتباط این ژن را در موقعیت ۶۸۹ و ارتباط آن‌ها با اسیدفولیک، ویتامین B12 و هموسیستئین در آینده بررسی شود.

در این راستا در سال ۲۰۰۹ مورالس و همکاران نشان دادند که پلی‌مورفیسم C677T تأثیر چندانی در افزایش سندرم سقط مکرر جنین ندارد (۱۵). همچنین بررسی‌های انجام‌شده بر روی جمعیتی از زنان استرالیایی نشان داد که پلی‌مورفیسم C677T ژن MTHFR در سقط مکرر جنین تأثیر چندانی ندارد (۱۶).

این در حالی است که ونگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داند که پلی‌مورفیسم C677T ژن MTHFR در سقط مکرر در جمعیتی از زنان چینی نقش دارد (۱۷). همچنین مطالعات انجام

شده بر روی ۲۰۰ زن باردار در سال ۲۰۰۶ حاکی از افزایش معنادار سقط مکرر جنین در زنان دارای پلی‌مورفیسم در ژن MTHFR بود (۱۸). رودریگز گویلن و همکاران در سال ۲۰۰۹ دریافتند افرادی که دارای ژن MTHFR 677TT و MTHFR 1298AC هستند، به ترتیب باعث افزایش خطر سقط خودبه‌خودی می‌شود. پس بدون در نظر گرفتن مصرف ویتامین B، پلی‌مورفیسم MTHFR به‌عنوان یکی از فاکتورهای خطرناک برای سقط خود به خودی به شمار می‌رود (۱۹). تیواری و همکاران در سال ۲۰۱۵ جهش ژن پلی‌مورفیسم MTHFR را به‌عنوان فاکتور ژنتیکی برای زایمان زودرس، مرگ جنینی و وزن کم هنگام تولد در جمعیت شمال شرقی هند بررسی کردند. یافته های آن‌ها نشان داد جهش ژن پلی‌مورفیسم MTHFR C677T خطر زایمان زودرس را افزایش می‌دهد. جهش ژن پلی‌مورفیسم MTHFR C677T ممکن است به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی در موارد حاملگی‌هایی که مستعد زایمان زودرس، استفاده شود؛ بنابراین خطرات مرتبط به زایمان زودرس در کنترل است (۲۰). ژاو و همکاران در سال ۲۰۱۵، ۲ گروه ۱۰۰ تا بیمار ترومبوآمبولی وریدی را در بیمارستان وابسته به دانشگاه علوم پزشکی سین کیانگ در چین، ارتباط ژن پلی‌مورفیسم MTHFR با بیماری VTE، اندازه‌گیری چربی خون نمونه‌های خود را انتخاب کردند و به این نتیجه رسیدند که ژن MTHFR و سطح بالای هموسیستئین به‌خصوص افراد سیگاری با بیماری VTE ارتباط مثبتی دارد (۲۱).

در طی تحقیق انجام‌شده در این پروژه مشخص شد که افزایش میزان هموسیستئین و کاهش اسیدفولیک و ژن پلی‌مورفیسم MTHFR C677T سبب سقط‌های مکرر در جمعیت استان اصفهان می‌گردد. در ادامه در جهت هدف‌های در نظر گرفته‌شده، به مواردی ازجمله آمار جمعیتی، موقعیت‌های جغرافیایی و ژن-های مؤثر دیگر برخورد شد که می‌توان در مطالعه و تحقیق بیشتر بر روی آن‌ها تمرکز نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت اجرایی کمال تشکر را دارند. کد مصوبه پایان‌نامه ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۵۱۰۰۹ می باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertility and sterility. 2013;99(1):63.
2. Dovom MR, Tehrani FR, Abedini M, Amirshekari G, Hashemi S, Noroozzadeh M. A population-based study on infertility and its influencing factors in four selected provinces in Iran (2008-2010). Iranian journal of reproductive medicine. 2014;12(8): 561. [Article In Persian]
3. Mohtasebi M, Mojalal-Saghafi SH. Medical Information for Woman. 1st ed. Tehran: Rasa Press; 2007, P.11-136. [In Persian]
4. Tabong PT, Adongo PB. Understanding the social meaning of infertility and childbearing: a qualitative study of the perception of childbearing and childlessness in Northern Ghana. PloS one. 2013;8(1): e54429.
5. Ajith TA. Homocysteine in ocular diseases. Clinica Chimica Acta. 2015; 450(1):316-21.
6. Patel AP, Chakrabarti C, Singh A, Pate JD, Mewada HA, Sharma SL. Effect of Homocysteine, Vitamin B12, Folic acid during pregnancy. NHL J Med Sci. 2012; 1(1):27-31.
7. Guilland JC, Favier A, Potier DC, Galan P, Hercberg S. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor or a simple marker of vascular disease? 1. Basic data. Pathologie-biologie. 2003;51(2):101-10.
8. Gilbody S, Lewis S, Lightfoot T. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: A HuGE review. American journal of epidemiology. 2007;165(1):1-3.
9. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nature genetics. 1995;10(1):111-3.
10. Cunha AL, Hirata MH, Kim CA, Guerra-Shinohara EM, Nonoyama K, Hirata RD. Metabolic effects of C677T and A1298C mutations at the MTHFR gene in Brazilian children with neural tube defects. Clinica chimica acta. 2002;318(1):139-43.

11. Kim KN, Kim YJ, Chang N. Effects of the interaction between the C677T 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and serum B vitamins on homocysteine levels in pregnant women. European journal of clinical nutrition. 2004;58(1):10-6.
12. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ, et al. 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C→ T and 1298A→ C mutations are associated with DNA hypomethylation. Journal of medical genetics. 2004;41(6):454-8.
13. Bakker RC, Brandjes DP. Hyperhomocysteinaemia and associated disease. Pharmacy world & science: PWS. 1997;19(3):126-32.
14. Freitas AI, Mendonça I, Guerra G, Brión M, Reis RP, Carracedo A, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene, homocysteine and coronary artery disease: the A1298C polymorphism does matter. Inferences from a case study (Madeira, Portugal). Thrombosis research. 2008;122(5):648-56.
15. Morales-Machin A, Borjas-Fajardo L, Quintero JM, Zabala W, Alvarez F, Delgado W, et al. C677T polymorphism of the methylentetrahydrofolate reductase gene as risk factor in women with recurrent abortion. Investigacion clinica. 2009;50(3):327-33.
16. Hohlagschwandtner M, Unfried G, Heinze G, Huber JC, Nagele F, Tempfer C. Combined thrombophilic polymorphisms in women with idiopathic recurrent miscarriage. Fertility and sterility. 2003;79(5):1141-8.
17. Wang XP, Lin QD, Ma ZW, Zhao AM. C677T and A1298C mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in unexplained recurrent spontaneous abortion. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2004;39(4):238-41.
18. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. Reproduction. 2006;131(2):395-401.
19. Rodríguez-Guillén MD, Torres-Sánchez L, Chen J, Galván-Portillo M, Blanco-Muñoz J, Anaya MA, et al. Maternal MTHFR polymorphisms and risk of spontaneous abortion. salud pública de méxico. 2009;51(1):19-25.
20. Tiwari D, Bose PD, Das S, Das CR, Datta R, Bose S. MTHFR (C677T) polymorphism and PR (PROGINS) mutation as genetic factors for preterm delivery, fetal death and low birth weight: A Northeast Indian population based study. Meta gene. 2015; 3(1):31-42.
21. Den Heijer M, Lewington S, Clarke R. Homocysteine, MTHFR and risk of venous thrombosis: a meta-analysis of published epidemiological studies. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2005;3(2):292-9.

Original Article

Investigating the Relationship Between C677T Polymorphism of the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and the Levels of Homocysteine in Primary and Secondary Infertile Women in Isfahan

Sonbolestan ES[1], Sazegar H[1]*, Zia-Jahromi N[1], Mohamadi Farsani F[1,2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord Branch,Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Department of Genetics, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, IR Iran

Received: 27 Apr 2017 Accepted: 17 Dec 2017

Abstract

Background & Objectives: Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene, as an important genetic factor affecting infertility, encodes Methyl Dihydrofolate Reductase enzyme which helps to regulate the levels of homocysteine in the body. Mutations in this gene can reduce the activity of the enzyme, which leads to increase levels of blood homocysteine and may cause infertility. The purpose of this research was to investigate the relationship between C677T polymorphism of MTHFR gene and infertility.

Material & Methods: In this study, 100 samples from infertile and fertile women with a history of abortion and 100 healthy pregnant were selected. After extracting the DNA from peripheral blood, the genotype of the samples was analyzed by PCR-RFLP method. SPSS software was also used to investigate the relationship between C677T polymorphism and infertility (using t. test, Chi-square test and logistic regression).

Results: C677T polymorphism of MTHFR gene, resulted in a significant increase in the level of homocysteine and decrease levels of folate and vitamin B12 in homozygous women. However, there was not any relationship between the genotype of heterozygous patients with the level of homocysteine, folate and vitamin B12.

Conclusion: C677T polymorphism of MTHFR gene may be associated with the increased levels of homocysteine and decreased levels of folic acid and vitamin B12 in the body, which can cause fetus recurrent miscarriage syndrome.

Keywords: Methylene Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) gene, Infertility, Polymorphisms, Homocysteine, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

***Corresponding Author: Hossein Sazgar,** Department of Biology, Faculty of Sciences, Azad University, Shahrekord branch, Shahrekord, Iran.
Email: hoseinsazgar@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 8 (2018): 647- 656