

مقاله پژوهشی

ارتباط پلی مورفیسم 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^{۲*}، نوشا ضیاء جهرمی^۱، فرزانه محمدی فارسانی^۲

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 به عنوان یکی از عوامل ژنتیکی مؤثر بر ناباروری، آنزیم متیلن 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 به نوبه‌ی خود منجر به افزایش سطح هموسیستئین خون شده و می‌تواند باعث ایجاد ناباروری شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پلی مورفیسم 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 با سابقه‌ی سقط و ۱۰۰ نمونه زن باردار سالم انجام گرفت. بعد از استخراج DNA از خون محیطی، تعیین ژنوتیپ به وسیله‌ی روش PCR-RFLP انجام شد. جهت بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم و زنان نابارور از نرم‌افزار SPSS (با کمک آزمون t، آزمون خی-دو و رگرسیون لجستیک) استفاده گردید.

نتایج: پلی مورفیسم 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 پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR می‌تواند با افزایش سطح هموسیستئین و همچنین کاهش سطح اسیدفولیک و ویتامین موجب ایجاد سندرم سقط مکرر جنین گردد.

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

مقدمه

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 بعد از آن 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

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

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

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 چهار 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. میتل 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 می‌شود 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 روش‌های پزشکی مکمل یا جایگزین قرار می‌گیرند. هموسیستئین محصولی اضافی پس از تولید SAME است. میتل فولات در کنار میتل کوبالامین به تبدیل هموسیستئین به متیونین کمک می‌کند. تا زمانی که ژن MTHFR طی عملکرد خود، میتل 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 به‌طور جدی غربال‌گری برای ناهنجاری ژنتیکی MTHFR 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 روش‌ها

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

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 لوله‌های 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 اسیدآمین غیر پروتئینی است که از اسیدآمین متیونین ایجاد می‌شود در این حالت متیونین عامل میتل 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 ۲/۳-۵/۴ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر است. در صورتی که این مقدار افزایش یابد برای زنان باردار بسیار خطرناک است. عواملی که باعث افزایش هموسیستئین می‌شود، میزان بالای فولیک اسید، پیروکسین و کوبالامین در رژیم غذایی، بیماری‌هایی نظیر کلیوی، آلزایمر، کم‌کاری تیروئید و سرطان‌های خاص، مصرف بیش‌ازحد الکل و عوامل ژنتیکی از جمله 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 میتل هیدروفولات ردوکتاز را کد می‌کند 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 اسیدآمین آلانین به والین می‌شود (۹). این ژن بر روی فاکتورهای انعقادی نیز تأثیر می‌گذارد، برای مثال

تعیین ژنوتیپ

به منظور تعیین ژنوتیپ افراد مورد بررسی از روش PCR-RFLP استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای انجام واکنش PCR، بر اساس توالی ژن MTHFR انسان طراحی و سنتز گردید. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. شرایط واکنش PCR و برنامه بهینه شده 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 ۱۰۰ u/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 سانتی گراد جهت کامل گشتن هضم آنزیمی قرار گرفت و در نهایت محصولات هضم آنزیمی توسط الکتروفورز با ژل ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور، حدود ۲/۵ میلی-لیتر از خون هر فرد، از بیمارستان بهشتی و مرکز ناباروری اصفهان، جمع آوری شد. اطلاعات مرتبط با علت سقط، داروهای مورد استفاده در افراد و فعالیت‌های آن‌ها نیز از طریق تهیه پرسشنامه مورد بررسی قرار گرفت. قابل ذکر است که در این مطالعه توجه شد که سقط زنان مورد آزمایش به واسطه فعالیت ورزشی نباشد. همان گونه که اشاره شد، میزان حجم نمونه گرفته شده حدود ۲/۵ میلی لیتر خون بوده که پس از نمونه گیری، به صورت کامل با EDTA در لوله‌ها مخلوط شد. لوله حاوی خون، جهت سالم ماندن در کوتاه ترین زمان ممکن بر روی یخ به فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید. پس از جمع آوری نمونه‌ها با روش‌های علمی و اختصاصی، استخراج DNA با استفاده از کیت سینا ژن انجام گرفت و DNA استخراج شده جهت استفاده در مراحل بعد در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمر

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

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

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

ماده	غلظت محلول	حجم مورد استفاده (μl)	غلظت نهایی در واکنش
آب		۱۷/۵	-
PCR بافر	۱۰ X	۲/۵	۱ X
MgCl ₂	۵۰ میلی مولار	۰/۷۵	۱/۵ میلی مول بر لیتر
dNTP	۱۰ میلی مولار	۰/۵	۰/۲ میلی مول بر لیتر
پرایمر پیشرو	۱۰ میلی مولار	۱	۰/۴ میکرو مول بر لیتر
پرایمر معکوس	۱۰ میلی مولار	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 به صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل PCR شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طولی سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت.

آن، ۲۰ لاندای سرم بیمار با ۲۰ لاندای محلول Reagent1 مخلوط شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت 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، مورد استفاده قرار گرفت.

برای این نمونه خاص در افراد هتروزیگوت و هموزیگوت میزان هموسیستئین از رنج نرمال (۵-۱۷) 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 مورد بررسی، محصولات حاصل از PCR هر نمونه با استفاده از آنزیم Hinf1 برش داده شد. نتایج نشان داد در افراد سالم جایگاهی برای برش آنزیمی

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



اندازه‌گیری هموسیستئین

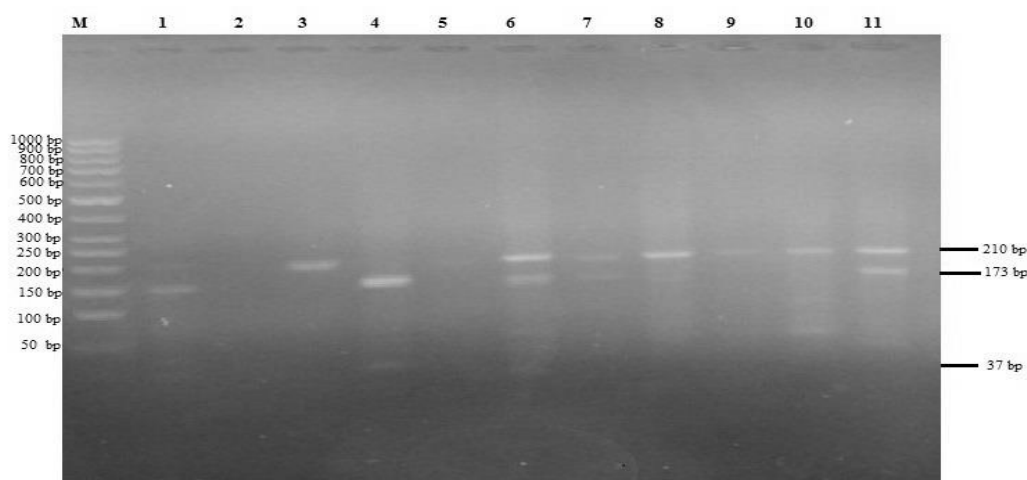
اندازه‌گیری هموسیستئین به روش فتومتریک با دستگاه Mindry BS 800 انجام گرفت. در این روش پس از نمونه‌گیری ۲cc خون از بیمار و سانتریفیوژ کردن خون و جدا کردن سرم آن، ۳ لاندای سرم بیمار با ۱۰۰ لاندای محلول Reagent1 مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲۵ لاندای Reagent2 به مخلوط بالا اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. در نهایت میزان هموسیستئین در طول ۳۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری اسیدفولیک

اندازه‌گیری اسیدفولیک به روش الکتروکمی لومینسانس با دستگاه Cobase 411 انجام گرفت. در این روش پس از نمونه‌گیری ۲cc خون از بیمار و سانتریفیوژ کردن خون و جدا کردن سرم آن، ۲۰ لاندای سرم بیمار با ۲۰ لاندای محلول Reagent1 مخلوط شد و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت 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

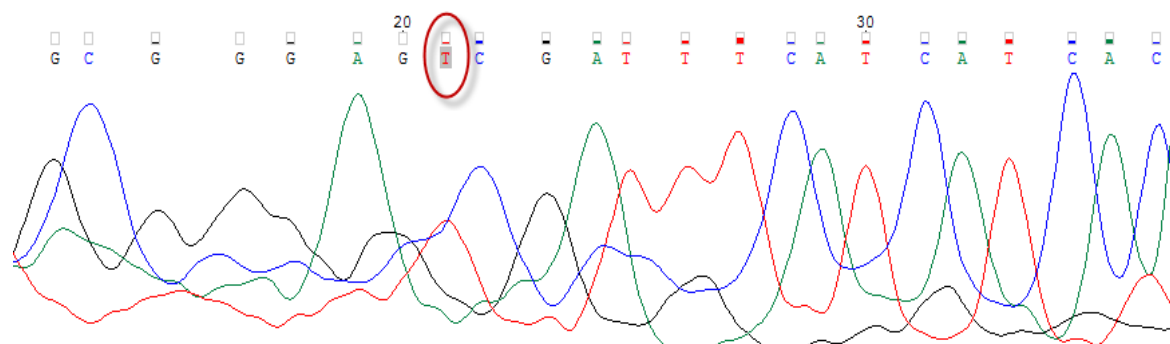


شکل ۱- محصولات PCR-RFLP. در این تصویر، چاهک‌های ۱ و ۴ مربوط به افراد هموزیگوت، چاهک‌های ۶، ۷ و ۱۱ مربوط به افراد هتروزیگوت و چاهک‌های ۳، ۸، ۹ و ۱۰ مربوط به افراد سالم می‌باشند.

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 ($T=3/253$ و $P=0/004$). همچنین مقایسه سطح هموسیستئین در خون افراد سالم و هتروزیگوت بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح

وجود ندارد و بنابراین DNA دست‌نخورده و با طول ۲۱۰ جفت باز باقی می‌ماند در حالی که 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 تأیید 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



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



نمودار ۱- درصد افراد دارای فاکتورهای خونی غیرطبیعی

هموسیستئین خون آن‌ها بود ($T=0/958$ و $P\text{-Value}=0/34$). 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 ($\chi^2=27/092$ و $P=0/001$). این در حالی است که از لحاظ آماری در سطح اطمینان

تصویر محل تغییر نوکلئوتیدی با دایره قرمز رنگ نشان داده شده است. حضور جهش در این توالی با استفاده از ابزار BLAT Search Result در سایت NCBI مورد تأیید قرار گرفت. همان‌گونه که در نمودار ۱ قابل مشاهده است، نتایج بررسی بیان می‌کند که از ۱۰۰ نمونه خون زنانی که سقط مکرر داشتند

همچنین مقایسه سطح اسیدفولیک در خون افراد سالم و هتروزایگوت بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح اسیدفولیک خون آن‌ها بود ($T=0/391$ و $P\text{-Value}=0/697$). بررسی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون خی - دو نشان داد که ارتباط متقابل بین کاهش سطح اسیدفولیک در خون و هتروزایگوت بودن فرد وجود دارد ($\chi^2=16/947$ و $P\text{-Value}<0/001$).

این در حالی است که از لحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارتباطی بین هتروزایگوت بودن و کاهش سطح اسیدفولیک در خون فرد وجود ندارد ($\chi^2=1/207$ و $P\text{-Value}=0/272$). ارتباطی بین هتروزایگوت بودن و کاهش سطح B12 در خون فرد وجود ندارد ($\chi^2=2/920$ و $P\text{-Value}=0/087$).

رگرسیون لجستیک برای ارزیابی میزان تغییرات سه فاکتور پیش‌بین میزان هموسیستئین، ویتامین B12 و اسیدفولیک در افراد هتروزایگوت و هموزایگوت نسبت به افراد سالم اجرا شد. برای افراد هموزایگوت مدل کلی شامل همه پیش‌بینی‌ها به لحاظ آماری معنی‌دار بود ($\chi^2=22/688$, $N=117$), χ^2 , $P<0/001$.

این نشان می‌دهد که این مدل می‌تواند افراد هموزایگوت 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

۹۵ درصد ارتباطی بین هتروزایگوت بودن و افزایش سطح هموسیستئین در خون فرد وجود ندارد ($\chi^2=2/789$ و $P\text{-Value}=0/095$).

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 هتروزایگوت این رقم به ۱۱/۱۱ درصد و نهایتاً ۴۱/۱۸ درصد از افراد هموزایگوت 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 هموزایگوت و سالم بود ($T=3/666$ و $P\text{-Value}<0/001$). همچنین مقایسه سطح ویتامین B12 در خون افراد سالم و هتروزایگوت بیانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ویتامین B12 خون آن‌ها بود ($T=1/500$ و $P\text{-Value}=0/136$).

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از آزمون خی - دو نشان داد که ارتباط متقابل بین کاهش سطح ویتامین B12 در خون و هموزایگوت بودن فرد وجود دارد ($\chi^2=29/268$ و $P\text{-Value}<0/001$). این در حالی است که از لحاظ آماری در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارتباطی بین هتروزایگوت بودن و کاهش سطح ویتامین B12 در خون فرد وجود ندارد ($\chi^2=2/920$ و $P\text{-Value}=0/087$). بررسی سطح اسیدفولیک خون نشان می‌دهد که در گروه شاهد ۹ درصد از افراد دارای اسیدفولیک پایین‌تر از حد طبیعی بودند این در حالی است که در افراد هتروزایگوت این رقم

جدول ۳- مدل رگرسیون لجستیک برای افراد هموزایگوت و سالم

	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
اسیدفولیک	-0/76	0/168	0/205	1	0/651	0/927	0/667	1/288
B12	0/008	0/006	1/877	1	0/171	1/009	0/996	1/021
هموسیستئین	-0/205	0/078	6/853	1	0/009	0/814	0/698	0/950
ثابت	2/334	1/583	2/174	1	0/140	10/319		

را به‌درستی طبقه‌بندی نماید. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود پیش‌بینی سطح هموسیستئین خون دارای سهم معنادار در مدل است.

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

به ۱۴/۸۱ درصد و نهایتاً ۴۷/۰۶ درصد از افراد هموزایگوت 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 هموزایگوت و سالم بود ($T=3/452$ و $P\text{-Value}=0/001$).

نتایج حاصله نشان داد که وجود پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR می‌تواند با افزایش سطح هموسیستئین ($\chi^2=27/092$) و ($P\text{-Value}<0/001$) و همچنین کاهش سطح اسیدفولیک ($\chi^2=16/947$) و ($P\text{-Value}<0/001$) و ویتامین B12 ($\chi^2=29/268$) و ($P\text{-Value}<0/001$) موجب ایجاد سندرم سقط مکرر جنین گردد. 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 افزایش یافته و در خطر 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 جهش یافته دیده شد یعنی هر دو ژن آن جهش یافته است و از نظر MTHFRC677T مثبت است و هموزیگوت بیمار محسوب می‌گردد. در صورتی که نمونه دارای یک قله در ناحیه مربوط به ژن جهش یافته و یک قله در ناحیه مربوط به ژن سالم باشد، یعنی یکی از ژن‌های آن طبیعی و MTHFR دیگری معیوب است و از نظر MTHFRC677T مثبت است و هتروزیگوت محسوب می‌گردد. در صورتی که نمونه فقط دارای یک قله در ناحیه مربوط به ژن سالم باشد، یعنی هر دو ژن آن طبیعی است و از نظر 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 ارتباط آن‌ها با اسیدفولیک، ویتامین B12 و هموسیستئین در آینده بررسی شود.

در این راستا در سال ۲۰۰۹ مورالس و همکاران نشان دادند که پلی مورفیسم C677T تأثیر چندانی در افزایش سندرم سقط مکرر جنین ندارد (۱۵). همچنین بررسی‌های انجام شده بر روی جمعیتی از زنان استرالیایی نشان داد که پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در سقط مکرر جنین تأثیر چندانی ندارد (۱۶). این در حالی است که ونگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR در سقط مکرر در جمعیتی از زنان چینی نقش دارد (۱۷). همچنین مطالعات انجام

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 $P\text{-Value} < 0/005$ معنی‌دار است. ارزیابی فاکتورهای پیش‌بین در مدل ارائه شده توسط رگرسیون لجستیک برای افراد هتروزیگوت نشان داد که مدل ارائه شده 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 ($\chi^2=7/263$, $N=154$, $P=0/064$). به علاوه مدل تنها ۶۶/۲ درصد از داده‌ها را به درستی طبقه‌بندی کرده بود. از طرف دیگر آزمون مدل بر مبنای آزمون هوسمر و لمشو در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنادار نبود ($\chi^2=5/038$, $N=154$, $P=0/754$).

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 به دست آمده برای رگرسیون لجستیک افراد هتروزیگوت در توافق کامل با نتایج به دست آمده از آزمون خی دو است و بیان دارد که این فاکتورهای خونی تنها می‌توانند در افراد هموزیگوت به عنوان شاخص عمل نمایند و میزان آن‌ها در افراد هتروزیگوت نسبت به افراد عادی تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری ندارد.

بحث و نتیجه گیری

مطالعات انجام شده بر روی جوامع مختلف، عوامل مختلفی را برای سندرم سقط مکرر جنین معرفی نموده‌اند که از میان این عوامل می‌توان کمبود فولات و پلی مورفیسم‌های ژن MTHFR اشاره کرد. در این مطالعات پلی مورفیسم‌های ژن MTHFR به عنوان عامل مهم در تخریب جفت در نظر گرفته می‌شوند این در حالی است که مطالعات دیگری حاکی از عدم ارتباط میان این پلی مورفیسم‌ها و سقط مکرر جنین است (۱۳، ۱۴).

در مطالعه انجام گرفته در این پژوهش، جهت رفع تضاد به وجود آمده در مطالعات قبلی و از آنجایی که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در این زمینه در حیطه‌ی استان اصفهان صورت نگرفته بود، به بررسی اثر غیرمستقیم پلی مورفیسم C677T ژن MTHFR بر روی سندرم سقط مکرر جنین به واسطه سه فاکتور خونی هموسیستئین، اسیدفولیک و ویتامین B12 پرداخته شد.

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 از جمله 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 می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

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. یافته‌های 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

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, Amirshakeri G, Hashemi S, Noroozadeh 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. Guillard 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. Methylentetrahydrofolate 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 methylentetrahydrofolate 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 methylenetetrahydrofolate 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 ES¹, Sazegar H^{1*}, Zia-Jahromi N¹, 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