مقاله پژوهشي

ارمغان دانش، مجله علمي پژوهشي دانشگاه علوم پزشكي ياسوج
دوره 19، شماره3، خرداد 1393 (شماره پي در پي86)

تعيين فراواني پلي مورفيسم rs2623047 ژن سولفاتاز 1 انساني در زنان با سابقه سقط مكرر و مقايسه آن با زنان نرمال از نظر باروري

اسكندر تقي زاده[1*]، محمد بخشي گنجه اي[1]، حسن تقي زاده[2]، فاطمه بني عامريان[2]

[1]گروه ژنتيک، دانشگاه علوم پزشكي يزد، يزد، ايران، [2]واحد مبارزه با بيماري‌ها، مركز بهداشت شهيد داميده، دانشگاه علوم پزشكي ياسوج، ياسوج، ايران
تاريخ وصول: 1392/6/11 تاريخ پذيرش: 1392/10/13

چكيده

زمينه و هدف: سقط مكرر عبارت از تشيخص باليني وقوع 3 يا بيش ازآن سقط خود به خودي است كه فاكتورهاي متعددي از جمله عوامل ژنتيكي و محيطي در آن دخالت دارد. در اين ميان ژن سولفاتاز1 انساني در رشد و نمو جنين نقش دارد. هدف اين مطالعه بررسي پليمورفيسم rs2623047 ژن سولفاتاز1 در زنان با سقط مكرر مراجعه كننده به مركز ناباروري يزد و مقايسه آن با زنان نرمال از نظر باروري است.

روش بررسي: در اين مطالعه موردـ شاهدي 65 زن سالم به عنوان گروه شاهد و 35 زن مبتلا به سقط مكرر به عنوان گروه مورد وارد مطالعه شدند. از افراد هر دو گروه نمونه خون گرفته شد و با استفاده از روش دستي كم نمک DNA آنها استخراج شد و تكثير قطعه داراي پلي مورفيسم rs2623047 از ژن سولفاتاز1 با روش PCR انجام شده و با استفاده از آنزيم BstNI عمل هضم آنزيمي‌صورت گرفت. داده‌ها با آزمون آماري مجذور كاي تجزيه و تحليل شدند.

يافته‌ها: ژنوتيپ GG در افراد گروه مورد 42/9 درصد و در افراد گروه شاهد 18/5 درصد بود (p=0/003). در حالي كه ژنوتيپ AG در افراد گروه شاهد 56/9 درصد و در افراد گروه مورد 37/1 درصد بود (p=0/003).

نتيجه‌گيري: تغييرات ژنتيكي در ژن سولفاتاز1 ممكن است داراي يک نقش در تكامل جنين در زمان حاملگي باشد و مطالعات گسترده‌تر با تعداد نمونه‌هاي بيشتر همراه با ديگر پلي مورفيسم‌هاي موجود در اين ژن مي‌تواند كمک كننده باشد.

واژه‌هاي كليدي: پلي مورفيسم، سقط مكرر، سولفاتاز1

*نويسنده مسئول: **اسكندر تقي‌زاده**، يزد، دانشگاه علوم پزشكي، دانشكده پزشكي، گروه ژنتيک

Email: eskandar.taghizadeh@yahoo.com

مقدمه

سقط مكرر عبارت است از تشيخص باليني وقوع 3 يا بيش از آن سقط خود به خودي يا يا بدون سابقه حاملگي كه قبل از هفته

بيستم اتفاق مي‌افتد و به طور كلي بين 3 تا 5 درصد زوجين را گرفتار مي‌كند (1). در ايجاد سقط‌هاي مكرر عوامل ژنتيكي، اختلالات آندوكريني، عوامل عفوني، آنتي‌فسفوليپيد آنتي‌بادي‌ها و ساير عوامل محيطي دخيل بوده وبقيه را به عوامل نامشخص نسبت مي‌دهند (2). بعضي زوجين هيچ علت مشخصي ندارند و شواهد قوياً حاكي از آن است كه نقش عوامل ژنتيكي در اين موارد چشمگير است. در ميان اختلالات تكژني نقش ژن سولفاتاز 1 كه در انسان به وسيله ژن SULF1 كد مي‌شود، در اختلالات رشد جنين به اثبات رسيده است. هپاران سولفات o-6 اندوسولفاتازها، نظير SULF1 به صورت انتخابي گروه هاي o-6 سولفات را از هپاران سولفات خارج مي‌كند (3). اين عملكرد با تغيير جايگاه‌هاي اتصال مولكول‌هاي پيام دهنده منجر به تنظيم و تعديل اثرات هپاران سولفات مي‌شود. هپاران سولفات پروتئوگليكان‌ها نيز به عنوان يک رسپتور كمكي براي تعداد زيادي از فاكتورهاي رشد و سايتوكاين‌ها عمل مي‌كنند (6ـ4) و اين گونه در مسير هاي پيام دهي مولكول‌هايي نظير Shh, Wnt, BMP, FGF,VEGF, HB-EGF, GDNF نقش بسزايي را ايفا مي‌كنند (7) و فرآيندهايي نظير رشد سلولي، تكثير، تمايز و مهاجرت را تحت تأثير قرار مي‌دهند (9 و8).

نقش ژنsulf1 در رشد و تكامل جنين به اثبات رسيده است. فرآيندهاي تكامل طبيعي موجودات بستگي زيادي به ارتباطات سلول‌ها با يكديگر دارد، كه اين قبيل برهمكنش‌هاي سلولي به وسيله طيف وسيع و متنوعي از مولكول‌ها و فاكتورهاي پروتئيني ترشح شده ميانجيگري مي‌شود. مطالعات ژنتيكي انجام شده برروي تكامل جنيني در موجوداتي نظير كرم حلقوي الگانس، دروزوفيلا، ماهي زبرا و موش اهميت بيولوژيكي پروتئوگليكان‌هايي نظير هپاران سولفات را در تنظيم فعاليت فاكتورهاي رشد متعدد و فرآيند تكاملي

مورفوژنز آشکار کرده است(11 و 10).

هم‌چنین ثابت شده است که بین پلي‌مورفیسم‌هاي مختلف این ژن و اختلالات رشد جنین ارتباط وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسي فراواني پلي‌مورفیسم rs2623047، G>A ژن سولفاتاز 1 انساني در زنان با سابقه سقط مکرر و مقایسه آن زنان سالم داراي باروري طبیعي بود.

روش بررسي

در این مطالعه با توجه به فراواني آلل G به میزان 41/5 درصد و آلل A به میزان 58 درصد حداقل تعداد نمونه 35 مورد به وسیله مطالعات آماري تعیین شده است. بنابراین تعداد 35 زن مبتلا به سقط مکرر که 3 یا بیشتر مورد سقط با علت ناشناخته داشته‌اند به عنوان گروه مورد و 65 زن سالم به عنوان شاهد که داراي حداقل یک فرزند سالم بودند وارد مطالعه شدند.

پس از انتخاب زنان داراي سقط مکرر و شرح موضوع تحقیق و کسب رضایتنامه از میان افراد مراجعه کننده به مرکز ناباروري یزد، از میان کساني که به علت سقط مکرر مراجعه کرده بودند، 5 سي‌سي خون محیطي گرفته شد. و درون لوله‌هاي حاوي حاوي ماده ضد انعقاد EDTA ریخته شد. در مرحله بعد از 65 زن سالم که داراي باروري طبیعي بودند با کسب رضایتنامه 5 سي‌سي خون گرفته شد. پس از جمع‌آوري نمونه‌ها با استفاده از روش دستی کم نمک[1]، DNA نمونه بیماران و افراد شاهد استخراج گردید و از یک جفت پرایمر به صورت فوروارد و ریورس استفاده شده و توالي پلي مورفیسم rs2623047 واقع در ناحیه پروموتور ژن سولفاتاز1 تکثیر شد. سپس محصول تکثیر شده PCR به مدت 16 ساعت در مجاورت با آنزیم محدود کننده BstNI که داراي جایگاه برش براي باز G بود، قرار داده شد. محصول حاصل از عمل هضم آنزیمي روي ژل آگاروز الکتروفورز شده و با باندهاي

تشكيل شده به وسيله اتيديوم بروماید قابل مشاهده گرديد و با استفاده از نشانگرها طول قطعات ايجاد شده اندازه‌گيري شد كه در صورت وجود سه قطعه براي هر چاهک ژنوتيپGA بود، ژنوتيپAA داراي يک قطعه و ژنوتيپGG داراي دو قطعه مي‌باشند.

در اين مطالعه، DNA نمونه خون‌هاي جمع‌آوري شده افراد مورد مطالعه با استفاده از روش كم نمک استخراج شدند. ابتدا مقدار 2سي‌سي از خون جمع‌آوري شده افراد درون لوله‌هاي فالكون 15 سي‌سي ريخته شده و با افزودن بافر ليز سلولي و سانتريفوز گلبول‌هاي قرمز ليز شده و گلبول‌هاي سفيد جدا مي‌شدند. به رسوب شفاف كه داراي سلول‌هاي سفيد[2] مي‌باشد، 1000 ميكروليتر ليز كننده هسته سلول اضافه شد. در مرحله بعد با استفاده از پروتئيناز K پروتئن‌ها هضم شده و پروتئين‌ها با استفاده از نمک سديم دود سيل سولفات و كلريدسديم رسوب داده شده و به وسيله اتانول مطلق كلاف DNA گرفته شد. در نهايت DNA در ميكروتيوب 1/5 جهت مراحل بعدي جمع‌آوري شدند.

براي ارزيابي كيفي DNA نمونه‌ها پس از استخراج از خون با روش اسپكتوفتومتري مورد آزمايش قرارگرفتند. ارزيابي DNA در طول موج 260 تا 280 نانومتر انجام شد. جذب نوري در 260 نانومتر غلظت DNA را نشان مي‌دهد و با اندازه‌گيري نسبت OD در طول موج‌هاي 260 و 280 (نسبت A_{260}/A_{280}) نانومتر مي‌توان درجه خلوص DNA را محاسبه كرد كه اگر عددي بين 1/6 تا 2 باشد ميزان خلوص DNA استخراج شده مطلوب خواهد بود. آلودگي با پروتئين موجب كاهش چشمگير در اين نسبت مي‌شود كه ميزان صحيح اسيدنوكلئيك را مشخص نمي‌كند، بلكه نشان‌دهندة كيفيت پايين **DNA** استخراج شده است. در صورت پايين بودن كيفيت دوباره كار استخراج انجام مي‌شود.

1- Salting Out
2-White Blood Cell

واکنش PCR با استفاده از محلول master mix حاوي کلريد منيزيم mgcl2، taq DNA polymerase و هريک از dGTP،dCTP،dATP وdTTP و پرايمرهاي فوروارد و ريورس اختصاصي با دماي آنيلينگ 52 درجه سانتي‌گراد انجام شد.

تنظيم دستگاه ترموسايکلر براي تکثير توالي پلي مورفيسم rs2623047 از ناحيه پروموتورژن سولفاتاز 1 به اين ترتيب انجام گرفت؛ در مرحله اول دناتوراسيون اوليه با دماي 95 درجه به مدت 5 دقيقه انجام گرفت و سپس جهت انجام مراحل بعد دناتوراسيون با دماي 95 درجه به مدت 30 ثانيه و آنيلينگ با دماي 55 سانتي گراد، براي تکثير توالي پلي مورفيسم rs2623047 ناحيه پروموتورژن سولفاتاز 1 به مدت 1 دقيقه انجام شد و سپس مرحله طويل‌سازي با دماي 72 درجه به مدت 1 دقيقه و در نهايت طويل‌سازي نهايي با دماي 72 درجه به مدت 10 دقيقه انجام گرديد.

طبق دستور کار حدود 20 ميکروليتر از آنزيم BstNI روي 20 تا 40 ميکروليتر محصول واکنش PCR ريخته شده و به مدت 16 ساعت در دماي 37 درجه سانتي‌گراد جهت عمل کردن آنزيم قرارداده شدند. ده ميکروليتر از محصولات PCR هضم شده نمونه‌ها به وسيله آنزيم محدودالاثرBstNI ، با 1 ميکروليتر بافر نمونه‌گذاري مخلوط شده و پس از مخلوط کردن به وسيله پيپت در چاهک‌هاي ژل آگارز2 درصد ريخته شد وتحت الکتروفورز قرار داده شدند و با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت مورد عکس‌برداري قرار گرفتند.

داده‌هاي جمع‌آوري شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماري مجذور کاي تجزيه و تحليل شدند.

يافته‌ها

بر اساس نتايج ژنوتيپ AG در افراد گروه شاهد بيشترين فراواني (56/9 درصد) را داشت، در حالي که در افراد گروه مورد در 37/1 درصد موارد مشاهده شد که اين اختلاف معني‌دار بود (p=0/03). هم‌چنين در افراد

گروه مورد بيشترين فراواني مربوط به ژنوتيپGG (42/9 درصد) بود و در افراد گروه شاهد اين ژنوتيپ فقط در 18/5 از موارد ديده شد كه اين تفاوت نيز معني‌دار بود (p=0/003). هم چنين نتايج حاصله نشان داد كه در افراد گروه شاهد ژنوتيپ نوع AG بيشترين فراواني را داشت (56/9 درصد)، در حالي كه در افراد گروه مورد ژنوتيپ نوع GG درصد بالايي را نسبت به دو نوع ديگر داشت (42/9 درصد) (جدول 1).

جدول 1: مقايسه فراواني نسبي (تعداد و درصد) ژنوتيپ هاي مشاهده شده در گروه‌هاي مورد مطالعه

ژنوتيپ گروه	AG	AA	GG	جمع
مورد	13 (37/1)	7(20)	15(42/9)	35(100)
شاهد	37(56/9)	16(24/6)	12(18/5)	65(100)
سطح معني داري		0/03		

بحث

سقط مكرر يكي از عوامل شايع در زنان دچار اختلال در باروري است كه عوامل ژنتيكي بيش از نيمي‌از موارد سقط را شامل مي‌شوند (12 و11). اين مطالعه با هدف بررسي پلي مورفيسم شماره rs2623047 ژن سولفاتاز 1 انساني در زنان با سابقه سقط مكرر انجام شد.

ژن مذكور كه در غشاي سلولي مستقر است به عنوان يک پردازشگر پس از رونويسي عمل مي‌كند و با حذف گروه هاي o-6 از پروتئوگليكان‌هايي نظير هپاران سولفات نقش مهمي‌را در تغيير جايگاه اتصال مولكولي‌هايي نظير FGF,VEGF,BMP,WNT,SHH ايفا مي‌كند و به اين ترتيب در طيف وسيعي از فرآيندهاي سلولي نظير آنژيوژنز، رشد و تكثير سلولي، ترميم و بهبود زخم‌ها و تكامل جنين دخيل مي‌باشد (3 و 13). نتيجه اين بررسي نشان داد، فراواني آلل G در زنان گروه مورد آزمايش به نسبت معني‌داري بيشتر از گروه شاهد مي‌باشد و اكثر مطالعات صورت گرفته بر روي اين ژن در زمينه بيان آن در سرطان‌هايي مانند تخمدان، سينه، معده و

هپاتوسلولار بوده‌اند که نتایج همه این مطالعات نشان دهنده کاهش بیان این ژن در بافت‌هاي سرطاني است که علت آن به نقش در تنظیم رگزایي بر مي‌گردد (14). در ارتباط با نقش ژن سولفاتاز 1 در تکامل جنین مي‌توان به مطالعه هولست و همکاران (2007) اشاره کرد که مشاهده کردند ناک اوت کردن ژن سولفاتاز 1و2 در جنین موش باعث کاهش بقاي آن مي‌شود (15). هم‌چنین بررسي‌هاي دیگري نشان داد که نبود یا کاهش محصول ژن سولفاتاز 1 و 2 باعث اختلالات عصبي، اسکلتي و عضلاني مي‌گردد (16).

تا کنون مشابه مطالعه حاضر بر روي زنان با سابقه سقط مکرر صورت نگرفته است و در مطالعه حاضر فراواني ژنوتیپي در بعضي موارد حاکي از وجود اختلافات معني‌داري بین دو گروه شاهد و زنان با سابقه سقط مکرر است. نتایج به دست آمده نشان داد که نسبت تعداد درصد فراواني‌هاي ژنوتیپ در دو گروه شاهد و آزمون با هم تفاوت معني‌داري دارد.

نتیجه‌گیري

با توجه به این که پلي‌مورفیسم ژن سولفاتاز 1 به عنوان یک پلي مورفیسم عمل کردي درناحیه پروموتر این ژن واقع شده است که تنظیم کننده فعالیت‌هاي این ژن در سطح رونویسي مي‌باشد بنابراین به نظر مي‌رسد که جایگزیني A با G مي‌تواند باعث تغییر در سطح فعالیت ژن سولفاتاز 1 شود که جهت تکامل اندام‌هاي جنیني لازم است و مي‌تواند باعث سقط جنین گردد.

با توجه به وجود محدویت‌هایي هزینه‌اي و زمان، موارد زیر جهت اطمینان بیشتر پیشنهاد مي‌شود؛ 1ـ انجام یک بررسي جامع با در نظر گرفتن دیگر پلي‌مورفیسم‌هاي کلینیکي ژن سولفاتاز 1، 2ـ بیان این ژن در مراحل لانه گزیني و

بعد از لانه گزيني با دقت بررسي گردد. 3ـ اين مطالعه با تعداد بيشتري نمونه انجام گردد.

تقدير و تشكر

اين مطالعه حاصل بخشي از پايان نامه مقطع كارشناسي ارشد رشته ژنتيک پزشكي بود كه با حمايت مالي دانشگاه علوم پزشكي شهيد صدوقي يزد و مركز ناباروري يزد انجام شد.

REFERENCES

1.Carrington BGو Sacks L. Regan, *Recurrent miscarriage: pathophysiology and outcome.* Curr Opin Obstet Gynecol 2005; 17(6): 591-7.
2.Gracia CR., et al. *Risk factors for spontaneous abortion in early symptomatic first-trimester pregnancies* .Obstet Gynecol 2005; 106(5 Pt 1): 993-9.
3.Han CH, Han CH[1], Huang YJ, Lu KH, Liu Z, Mills GB, Wei Q, Wang LE,*Polymorphisms in the SULF1 gene are associated with early age of onset and survival of ovarian cancer.* J Exp Clin Cancer Res 2011; 30: 5.
4.Nybakken KN. Perrimon, *Heparan sulfate proteoglycan modulation of developmental signaling in Drosophila.* Biochim Biophys Acta 2002; 1573(3): 280-91.
5.Rapraeger AC. *Heparan sulfate-growth factor interactions.* Methods Cell Biol 2002; 69: 83-109.
6.Sasisekharan RG. Venkataraman, *Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function.* Curr Opin Chem Biol 2000; 4(6): 626-31.

7.Lai JP, Sandhu DS, Shire AM, Roberts LR. *The tumor suppressor function of human sulfatase 1 (SULF1) in carcinogenesis.* J Gastrointest Cancer 2008; 39(1-4):149-58.
8.Saoncella S, Echtermeyer F, Denhez F, Nowlen JK, Mosher DF, Robinson SD, Hynes RO, Goetinck PF. *Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers.* Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96(6): 2805-10.
9.Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J. *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans.* Annu Rev Biochem 1999; 68: 729-77.
10.Folkman J. *Angiogenesis-dependent diseases.* Semin Oncol 2001; 28(6): 536-42.
11.Polverini PJ. *How the extracellular matrix and macrophages contribute to angiogenesis-dependent diseases.* Eur J Cancer 1996; 32A(14): 2430-7.
12.Zahraei M, shiekhha M,kalantar SM. *The association of arylendosulfatase 1 (SULF1) gene polymorphism with recurrent miscarriage.* J Assist Reprod Genet 2014 Feb;31(2):157-61. doi: 10.1007/s10815-013-0150-7. Epub 2013 Dec 10.
13.Ai X, Do A-T, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Lu K, Emerson CP. *Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2.* Journal of Biological Chemistry, 2006;. 281(8): 4969-76.
14. Jin-Ping Lai, Dalbir S. Sandhu, Abdirashid M. Shire, Lewis R. Roberts *The tumor suppressor function of human sulfatase 1 (SULF1) in carcinogenesis.* Journal of Gastrointestinal Cancer 2008; 39(1-4): 149-58.
15.Holst CR, Bou-Reslan H, Gore BB, Wong K, Grant D, Chalasani S. *Secreted sulfatases Sulf1 and Sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival.* PLoS One 2007; 2(6): e575.
16.Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD. *Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer.* Neoplasia 2005; 7(11): 1001.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Evaluation of gene rs2623047 polymorphism of human sulfatase1 in women with recurrent

abortion compared with women with normal fertility

Taghizadeh E[1*], Bakhshiganjae M[2], Taghizadeh H[2], Baniamerian F[2]

[1]Genetics group, Yazd university of Medical Sciences,Yazd,Iran, [2]Damideh Health Centre, Yasuj university of Medical Sciences,Yasuj,Iran

Received: 03 Aug 2013 Accepted: 04 Jan 2014

Abstract

Background & aim: recurrent miscarriage is defined as accruing of at least 3 clinical spontaneous abortions or more. Several factors including genetic and environmental factors are involved in it. Among them, sulftase1 gene *rs*2623047 has a role in the human embryonic development. The purpose of this study was to evaluate sulftase1 gene *rs*2623047 polymorphism in women with recurrent abortions referred to the infertility center of Yazd, Iran.

Methods: In the present case-control study, sixty-five healthy women were selected as controls and thirty-five women with recurrent miscarriage were included as cases. **B**lood samples were taken from both groups manually, using a low-salt DNA extraction and amplified fragment polymorphism rs2623047 1 sulfatase gene made by PCR and enzymic digestion conducted using BstNI enzyme. Results were analyzed using the chi-square test.

Results: GG genotype in cases were 42±9% and in control group 5/18% respectively (p=0.003). While the AG genotype in the control group was 9.56% and in the cases 1.37% (p=0.003).

Conclusions: Genetic variation in sulfatase 1 gene may have a role in embryonic development during pregnancy and larger studies with more samples along with other polymorphisms in this gene may be helpful.

Key words: Polymorphism, Recurrent miscarriage, Sulftase1

***Corresponding author:** **Taghi Zadeh E,** Department of Genetics, Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran
Email: eskandar.taghizadeh@yahoo.com