

Association of Polymorphisms of F2 (rs3136520) and PAI-1(rs6090) Genes with Recurrent Pregnancy Loss in Iranian Azeri Women

Mahsa Yousefian¹ , Seyed Abdolhamid Angaji^{2,*} , Elham Siasi³,
Seyed Ali Rahmani⁴, Shamci Abbasalizadeh Khiaban⁵

¹ PhD Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵ Professor, Department of Obstetrics & Gynecology, Women's Reproductive Health Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

* **Corresponding Author:** Seyed Abdolhamid Angaji, Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran. Email: Angaji@khu.ac.ir

Received: 21.04.2021

Accepted: 02.08.2021

How to Cite this Article:

Yousefian M, Angaji SA, Siasi E, Rahmani SA, Abbasalizadeh Khiaban SH. Association of Polymorphisms of F2 (rs3136520) and PAI-1(rs6090) Genes with Recurrent Pregnancy Loss in Iranian Azeri Women. *Avicenna J Clin Med.* 2021; 28(2): 118-125. DOI: 10.52547/ajcm.28.2.118

Abstract

Background and Objective: The mutation of F2 and PAI-1 genes can cause thrombophilia in women. The present study aimed to assess the relationship of recurrent pregnancy loss (RPL) with rs3136520 in F2 and rs6090 in PAI-1.

Materials and Methods: This case-control study was conducted on 120 women with idiopathic RPL as case group and 120 healthy women without any history of infertility or abortion with at least one healthy child as the control group. These subjects were referred to a private genetic lab by a gynecologist. Both polymorphisms were studied using the amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction approach, and the obtained data were analyzed in SPSS software (version 26) using the chi-squared test ($P \leq 0.05$).

Results: In the multiplicative model, there was a significant association between rs6090 and RPL (OR=0.222; 95% CI=0.082-0.599); nonetheless, no relationship was detected between rs3136520 and RPL (OR=1, 95% CI=0.488-2.049). Moreover, according to additive model, there was no association between rs3136520 and RPL; however, there was a significant relationship between AG genotype in rs6090 and RPL (OR=0.245; 95% CI=0.066-0.901).

Conclusion: As evidenced by the obtained results, there was a protective association between rs6090 and RPL; nonetheless, there was no relationship between rs3136520 and RPL.

Keywords: Coagulation Factors, Plasminogen Activator Inhibitor 1, Recurrent Abortion, Thrombophilia

مطالعه همراهی بین پلی مورفیسم‌های ژن‌های F2(rs3136520) و PAI-1(rs6090) با سقط مکرر در زنان آذری-ایرانی

مهسا یوسفیان^۱، سید عبدالحمید انگجی^{۲*}، الهام سیاسی^۳، سید علی رحمانی^۴، شمس‌علی زاده خیابان^۵

^۱ دانشجوی دکتری ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ دانشیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۳ استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۴ استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۵ استاد، گروه زنان و مامایی، مرکز تحقیقات سلامت باروری زنان، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول: سید عبدالحمید انگجی، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

ایمیل: Angaji@khu.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: دو ژن F2 و PAI-1 از ژن‌هایی هستند که جهش در آن‌ها به ایجاد ترومبوفیلی در زنان منجر می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط rs3136520 از ژن F2 و rs6090 از ژن PAI-1 با سندروم سقط مکرر است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی ۱۲۰ زن مبتلا به سقط مکرر بدون دلیل و ۱۲۰ زن بدون سابقه ناباروری و سقط و دارای حداقل یک فرزند سالم که توسط متخصص زنان و زایمان به یک آزمایشگاه ژنتیک پزشکی بخش خصوصی ارجاع داده شده بودند، به‌عنوان گروه‌های بیمار و کنترل در مطالعه شرکت داده شدند. پلی‌مورفیسم‌های rs3136520 و rs6090 با روش ARMS-PCR بررسی شدند و نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و آزمون مربع کا تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در مدل multiplicative ارتباط معنی‌داری بین rs6090 و سقط مکرر با $OR = 0.222$ و $CI = 0.082 - 0.599$ درصد مشاهده شد، ولی هیچ ارتباطی بین rs3136520 و سقط مکرر مشاهده نشد ($OR = 1$). بر اساس مدل additive نیز بین rs3136520 و سقط مکرر هیچ ارتباط معنی‌داری وجود نداشت، اما بین ژنوتیپ AG در rs6090 و سقط مکرر ارتباط معنی‌دار با $OR = 0.245$ و $CI = 0.066 - 0.901$ درصد وجود داشت.

نتیجه‌گیری: بین rs6090 و بروز سقط مکرر ارتباط معنی‌داری از نوع محافظتی وجود دارد، اما هیچ ارتباط معناداری بین rs3136520 و بروز سقط مکرر وجود ندارد.

واژگان کلیدی: پلاسمینوژن نوع ۱، پلی‌مورفیسم، ترومبوفیلی، سقط مکرر، فاکتورهای انعقادی، مهارکننده فعال‌کننده

مقدمه

می‌یابند [۴]. سقط مکرر نیز به ۲ یا تعداد بیشتری سقط متناوب اطلاق می‌شود [۵-۹] و تقریباً ۵ درصد از زنانی را درگیر می‌کند که در سن باروری هستند [۷]. عوامل خطری که امروزه با سقط مکرر ارتباط دارند عبارت‌اند از: آنوپلویدی در جنین، ناهنجاری‌های کروموزومی والدی، مشکلات اندوکرینی، عملکرد ناصحیح فاکتورهای ایمنولوژیکی، نقص‌های آناتومیکی اندام‌های تولید مثلی و الگوهای زندگی غیرسالم [۱۰].

سقط به ازدست‌رفتن یک بارداری تشخیص داده‌شده از نظر کلینیکی قبل از هفته ۲۰ام بارداری [۱] یا ازدست‌رفتن رویان/جنین زیر ۴۰۰ گرم اطلاق می‌شود. آبتنی‌های بیوشیمیایی، مولار و خارج رحمی به‌عنوان بارداری تلقی نمی‌شوند [۲] و معاینات اولتراسونیک یا شواهد هیستولوژیکی باید وجود بارداری داخل رحمی را تأیید کنند [۳]. گفته می‌شود که تقریباً ۱۵ درصد از بارداری‌ها با سقط خاتمه

جوامع مختلف دارد، به طوری که MAF آن در پروژه ۱۰۰۰ ژنوم برابر است با $A=0.045128/226$ ؛ لذا با در نظر گرفتن تغییر احتمالی در پروتئین ایجاد شده و شیوع زیاد پلی مورفیسم مذکور به نظر می رسد این پلی مورفیسم نیز کاندید مناسبی برای انتخاب به عنوان مارکر ژنتیکی احتمالی سقط مکرر است.

با توجه به اینکه ترومبوفیلی در بیش از نیمی از موارد سقط مکرر با علت نامشخص مطرح است، جست و جوی پیرامون یافتن مارکرهای ژنتیکی شایع مناسب در ژن های ایجادکننده آن همچنان ادامه دارد. از آنجاکه نتایج به دست آمده از پلی مورفیسم های پیش تر مطالعه شده شدیداً مبهم است و حتی در قومیت های واحد نتایج بسیار متفاوتی دارد، به نظر می رسد بتوان در پلی مورفیسم های دیگری از این ژن ها به دنبال مارکرهای مذکور گشت. از این رو، هدف از این مطالعه تعیین ارتباط rs3136520 از ژن F2 و rs6090 از ژن PAI-1 با سندرم سقط مکرر جنین در جمعیت آذری است.

مواد و روش ها

این مطالعه مورد-شاهدی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز و گرفتن رضایت نامه آگاهانه از افراد گروه های کنترل و بیماران مراجعه کننده به یک آزمایشگاه ژنتیک پزشکی بخش خصوصی در شهر تبریز در سال های ۱۳۹۹-۱۳۹۸ انجام شد. در این پژوهش از ۱۲۰ زن بیمار آذری-ایرانی زیر ۳۵ سال مبتلا به سقط مکرر بدون دلیل و ۱۲۰ زن آذری-ایرانی زیر ۳۵ سال با حداقل ۱ فرزند سالم و بدون سابقه ناباروری و سقط، به میزان ۵ سی سی خون وریدی گرفته و در لوله آزمایش حاوی ماده ضد انعقادی EDTA در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شد. تعداد نمونه مورد نیاز برای انجام آزمایش ها از طریق فرمول $N = (Z_{1-\alpha/2})^2 p(1-p)/d^2$ [۲۲] به دست آمد. طبق این فرمول ۹۶ نفر در هر گروه برای انجام مطالعه کافی بود. با این وجود ۱۲۰ نفر در هر گروه گنجانده شد. همچنین زوجین دارای سقط مکرر قبل از ورود به مطالعه از نظر کاربوتایپ بررسی شدند و زنانی که در خود آن ها یا در همسرشان هرگونه ناهنجاری کروموزومی رؤیت شده بود، از مطالعه خارج شدند.

استخراج DNA و بررسی خلوص DNA

DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج (KBC blood DNA Extraction Kit, Cat, No. K1135, Tehran, Iran) طبق دستورالعمل شرکت سازنده آن استخراج شد. سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با دستگاه Nanodrop به روش اسپکتوفوتومتری در طول موج های A260/280 سنجیده شد تا از خلوص DNA استخراج شده اطمینان حاصل شود. در حالت مطلوب اعداد به دست آمده در این طول موج ها باید بین ۱/۸ تا ۲ باشد.

سقط مکرر یکی از اصلی ترین معضلات سلامت برای پزشکان است و بار عاطفی سنگینی را بر خانواده های درگیر تحمیل می کند [۱۱]. این در حالی است که شناسایی علت ایجادکننده آن کمک شایانی در درمان و پیشگیری از بروز مجدد آن می کند؛ برای مثال، در مواردی خاص استفاده از درمان های دارویی نظیر اسیدفولیک، آسپرین و سایر داروهای ضدانعقادی می تواند راهگشا باشد [۱۲].

در دهه های گذشته ترومبوفیلی نیز به عنوان یک عامل خطر (با قابلیت درمان) در زنان مبتلا به سقط مکرر مورد توجه قرار گرفته است [۱۳]. ترومبوفیلی وضعیتی اکتسابی یا ژنتیکی است که مقدمات ترومبوز در سرخرگ ها و سیاهرگ ها را فراهم می آورد [۱۴]. ترومبوز در عروق باریک جفت دلیل بسیاری از سقطها با علت نامشخص است. البته حتی با دانستن تمامی این موارد، باز هم نقش ترومبوفیلی وراثتی (ژنتیکی) در ایجاد سقط مکرر مبهم است، ولی گفته می شود واریانتهای ژنتیکی مادری در ژن های مرتبط با مسیر انعقادی و فیبرینولیز ممکن است به سقط مکرر منجر شود [۱۳]. مطالعات گذشته بیشتر روی تبدیل G20210A (rs1799963) از فاکتور F2 [۱۷-۱۵] و PAI1 (rs1799762)-675 4G/5G متمرکز شده اند [۱۸، ۱۹]. هر دوی این ژن ها از جمله ژن های ایجادکننده ترومبوفیلی وراثتی هستند، اما مطالعات انجام یافته پیرامون دیگر پلی مورفیسم ها از این ژن ها بسیار اندک است.

یک عامل کلیدی در آبشار انعقادی، فاکتور انعقادی ۲ یا ترومبین است که توسط ژن پروترومبین کد می شود. پیش ساز این فاکتور پروترومبین است که توسط این فاکتور شکسته و سپس توسط فعالیت فاکتور ۱۰ انعقادی فعال می شود [۱۴]. rs3136520 یک واریانته اینترونی در ژن F2 است که اگرچه عملکرد دقیق آن هنوز نامشخص است، شیوع نسبتاً زیادی در جمعیت های مختلف دارد. به طوری که در پروژه ۱۰۰۰ ژنوم MAF آن به صورت $T=0.051917/260$ گزارش شده است. از این رو به نظر می رسد در صورت اثبات ارتباط آن با سقط مکرر، بتوان از این پلی مورفیسم به عنوان یک مارکر مناسب بهره جست.

مهارکننده فعال کننده پلاسمینوژن نوع ۱ (PAI-1) نوعی مهارکننده غالب بافتی و فعال کننده یورکیناز است [۲۰]. واریانتهی که عموماً از این ژن مطالعه می شود، نوعی پلی مورفیسم اضافه شده/حذف شده گوانین 1bp در منطقه ۶۷۵- است که با محل شروع رونویسی مرتبط است. ژن PAI-1 در فیبرینولیز نقش دارد؛ بنابراین، در اتیولوژی مرگ داخل رحمی، توقف رشد داخل رحمی، قطع شدگی زودرس جفت، سقط مکرر و پره کلامسی نقش دارد [۱۴]. rs6090 که بررسی ارتباط آن با سقط مکرر در این مطالعه مدنظر است، با ایجاد نوعی تبدیل $G>A$ باعث تبدیل والین ۱۷ به ایزولوسین (Val17Ile) در پروتئین تولیدی می شود. این واریانته نیز شیوع نسبتاً زیادی در

ژنوتایپینگ با ARMS-PCR

بررسی پلی مورفیسم های ژنتیکی rs3136520 از ژن Thrombin با gene accession Number = NC-00000007.14 و rs6090 از ژن SERPINE1 gene با accession Number = NC-013669.1 (Amplification Refractory Mutation System) PCR انجام شد. پرایمرهای استفاده شده پس از طراحی با سایت blast سایت NCBI از نظر اختصاصیت بررسی شدند و پس از حصول اطمینان از اختصاصیت پرایمرها، سفارش انجام گرفت. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. به منظور افزایش اختصاصیت پرایمر یک mismatch اضافی در نوکلئوتید دوم سر ۳ پرایمرهای طبیعی و جهش یافته طراحی شد.

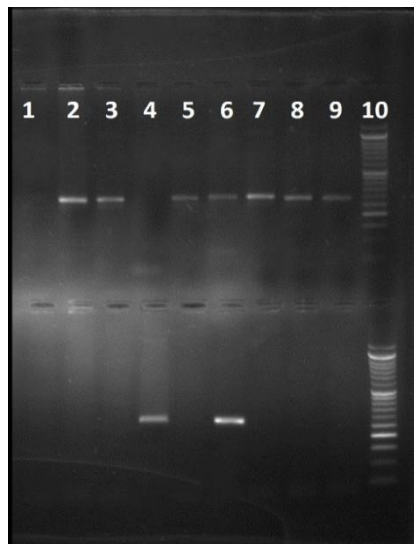
واکنش تکثیر در دستگاه ترمو سایکلر (Peqlab, Peq Star Erlangen, Germany) با استفاده از دو تیوپ برای هر نمونه (یک تیوپ برای آلل وحشی و تیوپ دیگر برای آلل جهش یافته) با بهره گیری از روش ARMS-PCR انجام گرفت. هر تیوپ شامل یک جفت پرایمر (پرایمر وحشی/جهش یافته و پرایمر مشترک) از هر یک به میزان ۲ میلی لیتر، ۲۵ میلی لیتر از Cat# 2×PCRBIO Taq Mix Red Master Mix (PB10.13-02, London, England) و ۵۰۰-۱۰۰ نانوگرم از

DNA ژنومی و مابقی تا حجم ۵۰ میلی لیتر آب دیونیزه بود. سپس به منظور انجام فرایند تکثیر، برنامه PCR به صورت زیر طراحی شد:

۵ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای مرحله واسرشت اولیه برای هر پلی مورفیسم و ۳۵ سیکل سه مرحله ای شامل ۳۰ ثانیه واسرشتی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برای F2 و دمای ۶۲ درجه سانتی گراد برای PAI-1 به عنوان دمای اتصال، ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به عنوان دمای تکثیر و نهایتاً ۲ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به عنوان دمای تکثیر نهایی منظور شد. واکنش PCR برای هر فرد و هر پلی مورفیسم به طور جداگانه ۲ بار انجام شد؛ یک بار با پرایمرهای رفت وحشی و برگشت مشترک برای rs3136520 و پرایمرهای برگشت وحشی و رفت مشترک برای rs6090 به منظور تعیین حضور یا عدم حضور آلل وحشی و بار دیگر با پرایمرهای رفت جهش یافته و برگشت مشترک برای rs3136520 و پرایمرهای برگشت جهش یافته و رفت مشترک برای rs6090 به منظور تعیین حضور یا عدم حضور آلل جهش یافته. سپس محصولات PCR برای آنالیز به ژل آگارز ۲ درصد انتقال یافت که با رنگ ژل بی ضرر رنگ آمیزی شده بود. از لدر 50bp نیز به عنوان معیار سنجش استفاده شد. شکل ۱ نمایی از ژل رنگ آمیزی شده ژن F2 و شکل ۲ نمایی از ژل رنگ آمیزی شده ژن PAI-1 را نمایش می دهد.

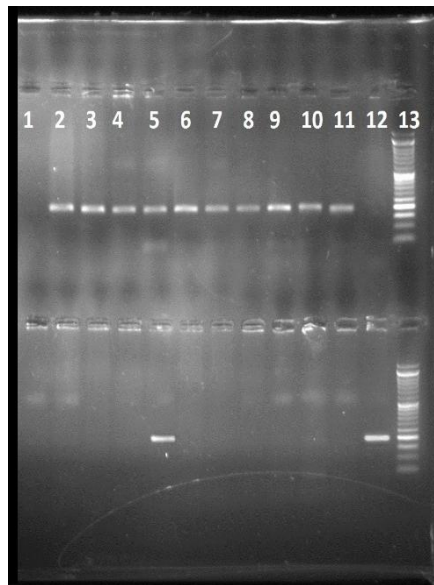
جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده

پلی مورفیسم	پرایمرها	طول قطعه حاصله
rs3136520	TGAAGGCACCTTTAGCTC: پرایمر رفت طبیعی	۲۸۷
	TGAAGGCACCTTTAGCTT: پرایمر رفت جهش یافته	
rs6090	AGAATCACTTGAATCCGCTA: پرایمر برگشت مشترک	۱۹۹
	TGCCCTAGTGTTCACTTACC: پرایمر رفت مشترک	
rs6090	GCAGACCCTTCACCAAAGTC: پرایمر برگشت طبیعی	۱۹۹
	GCAGACCCTTCACCAAAGTT: پرایمر برگشت جهش یافته	



شکل ۱: ژل آگارز ARMS-PCR ژن F2

باند‌های بالا نشان‌دهنده آلل طبیعی و باند‌های پایین نشان‌دهنده آلل جهش‌یافته هستند: ۱ کنترل منفی، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸ و ۹ هموزیگوت طبیعی CC، ۶ هتروزیگوت CT، ۴ هموزیگوت جهش‌یافته TT و ۱۰ لدر 50bp.



شکل ۲: ژل آگارز ARMS-PCR ژن PAI-1

باند‌های بالا نشان‌دهنده آلل طبیعی و باند‌های پایین نشان‌دهنده آلل جهش‌یافته هستند: ۱ کنترل منفی، ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ هموزیگوت طبیعی GG، ۵ هتروزیگوت GA، ۱۲ هموزیگوت جهش‌یافته AA و ۱۳ لدر 50bp.

است، در هر دو پلی‌مورفیسم تعادل هاردی-واینبرگ از طریق آزمون مربع کای بررسی شد تا بدین ترتیب از متعادل بودن یا نبودن جمعیت‌های مورد-شاهد در هر دو پلی‌مورفیسم اطمینان خاطر به عمل آید. نتیجه بررسی تعادل هاردی-واینبرگ در جدول ۳ آمده است.

نظر به اینکه هر دو جمعیت‌های بیمار و کنترل در هر دو پلی‌مورفیسم در تعادل هاردی واینبرگ بودند، از میان مدل‌های Multiplicative، Dominant و Recessive، مدل Multiplicative برای بررسی انتخاب شد. نظر به اینکه مدل Additive از وابستگی به تعادل هاردی واینبرگ فارغ است، این مدل نیز بررسی شد که به نتایج هر دو مدل پرداخته شد. ابتدا ارتباط بین rs6090 و rs3136520 با بیماری تحت مدل Multiplicative بررسی شد. نتایج به‌دست‌آمده از این بررسی در جدول ۴ آمده است. بر این اساس ارتباط معنی‌داری بین rs6090 و سقط مکرر با $OR=0.222$ و $CI=0.082-0.599$ و ۹۵ درصد مشاهده شد، ولی هیچ ارتباطی بین rs3136520 و سقط مکرر مشاهده نشد ($OR=1$ و $CI=0.488-2.049$).

پس از مشخص کردن ژنوتیپ هر فرد از طریق ARMS-PCR، برای مقایسه فراوانی آللی و ژنوتیپی از آزمون کاسکوئر و فیشر با سطح معناداری $P<0.05$ استفاده شد. به‌منظور بررسی همراهی بین پلی‌مورفیسم‌ها و سندروم سقط مکرر نیز از Odds ratio با فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تمام تحلیل‌های آماری با بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ با سطح معنی‌داری $P\leq 0.05$ انجام شد تا وجود یا نبود رابطه بین این دو پلی‌مورفیسم و سقط مکرر مشخص شود.

یافته‌ها

در این مطالعه، ۱۲۰ زن مبتلا به سقط مکرر به‌عنوان گروه بیمار و ۱۲۰ زن سالم به‌عنوان گروه کنترل شرکت کردند. میانگین سنی شرکت‌کنندگان در گروه کنترل ۲۷/۲ و در گروه بیمار ۲۴ سال بود. نتیجه بررسی خلوص DNAهای استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ و در طول موج A260/280 بازه‌ای بین ۱/۸۹۲-۱/۶۸۴ بود. برای بررسی نتایج به‌دست‌آمده، پس از تعیین ژنوتیپ هر فرد در گروه بیمار و کنترل و محاسبه فراوانی ژنوتیپی در هر گروه و دستیابی به ارزش P بین دو گروه که در جدول ۲ به آن‌ها پرداخته شده

جدول ۲: فراوانی ژنوتیپی در دو گروه بیمار و کنترل

ارزش P	گروه کنترل تعداد (درصد)	گروه بیمار تعداد (درصد)	ژنوتیپ	rs3136520
	۲ (۱/۷)	۴ (۳/۳)	TT	
۰/۵۱۷	۱۲ (۱۰)	۸ (۶/۷)	CT	
	۱۰۶ (۸۸/۳)	۱۰۸ (۹۰)	CC	

ارزش P	گروه کنترل تعداد(درصد)	گروه بیمار تعداد(درصد)	ژنوتیپ	rs6090
	۵ (۴/۲)	۱ (۰/۸)	AA	
۰/۰۱۸	۱۱ (۹/۲)	۳ (۲/۵)	AG	
	۱۰۴ (۸۶/۷)	۱۱۶ (۹۶/۷)	GG	

جدول ۳: بررسی تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت‌های rs3136520 و rs6090

پلی مورفیسم		گروه بیمار		گروه کنترل	
ژنوتیپ	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار	ژنوتیپ
TT (هموزیگوت جهش یافته)	۴	۰/۵۳۳۳	۲	۰/۵۳۳۳	فرکانس آلل T
CT (هتروزیگوت)	۸	۱۴/۹۳۳۳	۱۲	۱۴/۹۳۳۳	فرکانس آلل C
CC (هموزیگوت طبیعی)	۱۰۸	۱۰۴/۵۳۳۳	۱۰۶	۱۰۴/۵۳۳۳	فرکانس آلل A
ژنوتیپ	مشاهده شده	مورد انتظار	مشاهده شده	مورد انتظار	ژنوتیپ
AA (هموزیگوت جهش یافته)	۱	۰/۰۵۲۱	۵	۰/۹۱۸۷	فرکانس آلل A
AG (هتروزیگوت)	۳	۴/۸۹۵۸	۱۱	۱۹/۱۶۲۵	فرکانس آلل G
GG (هموزیگوت طبیعی)	۱۱۶	۱۱۵/۰۵۲۱	۱۰۴	۹۹/۹۱۸۸	فرکانس آلل G

جدول ۴: فرکانس ژنوتیپی پلی مورفیسم‌ها و مدل‌های ژنتیکی Additive و Multiplicative

Additive						پلی مورفیسم
CC	CC در مقابل TT+CT	CC در مقابل TC	CC در مقابل TT	T در مقابل C	Multiplicative	rs3136520
۱ (رفرانس)	۰/۸۴۱	۰/۶۵۴	۱/۹۶۳	۱	OR	
	۰/۳۷۲ - ۱/۹۰۳	۰/۲۵۷ - ۱/۶۶۵	۰/۳۵۲ - ۱۰/۹۴۵	۰/۴۸۸ - ۲/۰۴۹	95% CI	
	۰/۶۷۸	۰/۳۷۱	۰/۶۸۳	۱	ارزش P	
GG	GG در مقابل AG+AA	GG در مقابل AG	GG در مقابل AA	G در مقابل A	Multiplicative	rs6090
۱ (رفرانس)	۰/۲۲۴	۰/۲۴۵	۰/۱۷۹	۰/۲۲۲	OR	
	۰/۰۷۳ - ۰/۶۹۲	۰/۰۶۶ - ۰/۹۰۱	۰/۲۱ - ۱/۵۶۰	۰/۰۸۲ - ۰/۵۹۹	95% CI	
	۰/۰۰۵	۰/۰۲۳	۰/۱۰۹	۰/۰۰۱	ارزش P	

امروزه یکی از شایع‌ترین مشکلات زنان باردار، سقط مکرر خودبه‌خودی است. اگرچه بسیاری از دلایل ایجادکننده آن نامعلوم است، بر اساس مطالعات، عوامل ژنتیکی نقش عمده‌ای در بروز آن دارند. یکی از این عوامل، ترومبوفیلی وراثتی است که اخیراً به‌عنوان عامل احتمالی ایجادکننده سقط مکرر خودبه‌خودی مطرح شده است [۲۱، ۲۲]. با در نظر گرفتن اهمیت مشکل ترومبوفیلی در زنان باردار و ارتباط آن با سقط مکرر، آنالیز پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های درگیر در ترومبوفیلی در مکان‌های مختلف به‌عنوان یک استراتژی در تشخیص و درمان زود هنگام مطرح می‌شود [۱].

از جمله ژن‌های ایجادکننده ترومبوفیلی وراثتی می‌توان به

سپس احتمال داشتن ارتباط معنی‌دار بین این دو پلی‌مورفیسم و سقط مکرر تحت مدل Additive بررسی شد که نتایج آن در جدول ۴ آمده است. ژنوتیپ CC در rs3136520 و ژنوتیپ GG در rs6090، ژنوتیپ‌های وحشی هستند. پس به‌عنوان ژنوتیپ‌های الگو در نظر گرفته می‌شوند. بر اساس مدل Additive نیز بین rs3136520 و سقط مکرر هیچ ارتباط معنی‌داری وجود نداشت، اما بر اساس همین مدل در rs6090 بین ژنوتیپ AG و سقط مکرر ارتباط معنی‌دار با $OR=0/245$ و $CI=0/066-0/901$ درصد برقرار است.

بحث

جمعیت لبنانی، این پلی مورفیسم به عنوان یک عامل خطر در سقط مکرر گزارش شده است [۲۴].

Rs6090 یک تغییر بدمعنی (Missence) واقع شده در اگزون شماره ۲ از ژن PAI-1 است که باعث تبدیل اسید آمینه ایزولوسین ۱۷ به والین می شود [۲۵]. تا جایی که ما اطلاع داریم این اولین بررسی انجام شده در ارتباط با نقش این پلی مورفیسم در سقط مکرر خودبه خودی است، اما Yi Chen و همکاران در سال ۲۰۱۶ ارتباط بین آن و سرطان پستان را در جمعیت Han زنان چینی بررسی و ارتباط معنی داری بین حضور ژنوتیپ AA و بروز سرطان پستان را گزارش کرده است [۲۶]. این در حالی است که در مطالعه حاضر بین حضور ژنوتیپ AG و آلل A و سقط مکرر ارتباط معنی داری دیده شد. البته با این تفاوت مضاعف که ارتباط پیداشده در جمعیت Han از نوع مستعدکننده و ارتباط پیداشده در مطالعه حاضر از نوع محافظتی است. طبیعتاً دلیل اصلی این تفاوت صرف نظر از نژاد و منطقه جغرافیایی، به تفاوت در نوع بیماری برمی گردد.

از سوی دیگر پلی مورفیسمی از این ژن که بیشتر در ارتباط با سقط مکرر مطالعه شده، 675 4G/5G- با rs1799762 است. در رابطه با ارتباط موجود بین این پلی مورفیسم و سقط مکرر نیز نتایج بسیار متفاوتی در مطالعات به چشم می خورد؛ برای مثال، در مطالعه Jusić و همکاران در جمعیت بوسنیایی که در سال ۲۰۱۸ انجام شد، ارتباطی قوی بین این پلی مورفیسم و سقط مکرر گزارش نشد [۱۴]. El Achi و همکاران در جمعیت لبنانی در سال ۲۰۱۸ نیز این یافته را تأیید کردند [۲۴]. این در حالی است که در مطالعه ای مشابه که بیگدلی و همکاران در ایران در سال ۲۰۱۸ انجام دادند، این پلی مورفیسم به عنوان یک عامل خطر در ارتباط با سقط مکرر گزارش شد [۱].

نتیجه گیری

طبق نتایج می توان از rs6090 به عنوان یک بیومارکر ژنتیکی محافظتی در تشخیص دلایل ایجادکننده سقط مکرر در جمعیت آذری بهره جست. البته به منظور تأیید این نتیجه و حتی تعمیم آن به دیگر جمعیت های ایرانی، مطالعاتی با حضور جمعیت های اقوام دیگر و حتی خود قوم آذری در مقیاسی بزرگ تر مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره دکتری تخصصی ژنتیک مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است. از تمامی شرکت کنندگان در گروه های کنترل و بیمار به خاطر همکاری در فراهم سازی نمونه های خون و نیز کادر آزمایشگاه ژنتیک پزشکی دکتر رحمانی به خاطر یاری رسانی در انجام

PAI-I و F2 اشاره کرد که دو پلی مورفیسم مشهور G20210A (rs1799963) از ژن F2 و 675 4G/5G- (rs1799762) از ژن PAI-1 بارها در سایر مطالعات بررسی شده اند و از وجود ارتباط بین آن ها و سقط گزارش هایی منتشر شده است. از این رو مقرر شد پلی مورفیسم های دیگری از این دو ژن انتخاب و ارتباط آن ها با سقط مکرر بررسی شود.

نتایج حاصل از این مطالعه در ارتباط با پلی مورفیسم rs3136520 از ژن F2 و پلی مورفیسم rs6090 از ژن PAI-1 در جمعیت ایرانی- آذری نشان دهنده ارتباط معنی دار از نوع محافظتی بین سقط مکرر خودبه خودی و rs6090 از نظر آلل A در مدل Multiplicative با $OR=0/222$ و $OR=0/599$ و CI= $0/082$ و نیز ژنوتیپ AG با $OR=0/245$ و $OR=0/901$ در مدل Additive است. این در حالی است که هیچ ارتباطی بین rs3136520 و سقط مکرر خودبه خودی چه از نوع محافظتی و چه از نوع مستعدکننده، چه در سطح آلی و چه در سطح ژنوتیپی مشاهده نشد.

Rs3136520 نوعی پلی مورفیسم اینترونی در ژن F2 است و اطلاعات چندان دقیقی از عملکرد آن در دسترس نیست. بر اساس جست و جوی انجام شده در پایگاه های اطلاعاتی و استنادی از سوی نویسندگان، Zuing Xu و همکاران در سال ۲۰۱۸ در جمعیت Han زنان کشور چین، ارتباط با سقط مکرر را بررسی کرده و ارتباط معنی داری به صورت محافظتی هم از نظر ژنوتیپ TT و هم از نظر آلل T گزارش کرده است [۱۳]. این در حالی است که در مطالعه حاضر هیچ ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسم و سقط مکرر چه از نظر ژنوتیپ و چه از نظر آلل (مدل های Multiplicative و Additive) مشاهده نشد. از دلایل این تفاوت می توان به تفاوت در منطقه جغرافیایی، تفاوت در نژاد جمعیت های مطالعه شده و تفاوت در نوع انتخاب جمعیت ها اشاره کرد. در واقع یکی از مزایای مطالعه حاضر دقت و حساسیت زیاد در انتخاب جمعیت های مورد و شاهد است، به طوری که هر زنی با کمترین مشکل باروری تشخیص داده شده توسط متخصص زنان و زایمان یا هر زنی با کمترین ناهنجاری کروموزومی در خود یا همسر از مطالعه حذف شد.

از طرف دیگر پلی مورفیسم G20210A با rs1799963 قبلاً بارها در جمعیت های سقط مکرر خودبه خودی ارزیابی شده و نتایج متفاوتی از این ارزیابی ها حاصل شده است؛ برای مثال، Jusić و همکاران در سال ۲۰۱۸ در جمعیت بوسنیایی این پلی مورفیسم را بررسی کرد و ارتباط قوی ای بین این پلی مورفیسم و سقط مکرر گزارش نکرد [۱۴]. نتایجی مشابه در مطالعه Wingeyer و همکاران در سال ۲۰۱۹ در جمعیت آرژانتینی نیز به چشم می خورد [۲۳]. این در حالی است که در مطالعه مشابه El Achi و همکاران در سال ۲۰۱۸ در

مطالعه تشکر و قدردانی می‌کنیم.

نویسنده اول (پژوهشگر اصلی): تدوین پروپوزال، ژنوتایپینگ و نگارش مقاله ۲۰ درصد؛ نویسنده دوم (پژوهشگر اصلی): مسئول مکاتبات، طراحی پروژه، تحلیلگر آماری طرح و ویرایش علمی مقاله ۲۰ درصد؛ نویسنده سوم (پژوهشگر اصلی): تدوین بخش‌های مختلف پروژه و مشارکت در نگارش مقاله ۲۰ درصد؛ نویسنده چهارم (پژوهشگر همکار): نمونه‌برداری و مشاوره علمی ۲۰ درصد؛ نویسنده پنجم (پژوهشگر همکار): تشخیص‌های بالینی و مشاوره علمی ۲۰ درصد.

حمایت مالی

این پروژه هیچ‌گونه حمایت مالی دریافت نکرده است.

تضاد منافع

در این مطالعه هیچ‌گونه تعارضی در منافع نویسندگان وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

این طرح از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به شناسه IR.IAU.TABRIZ.REC.1398.022 تأییدیه است. همچنین از افراد گروه کنترل و بیمار رضایت‌نامه کتبی آگاهانه دریافت شد.

سهم نویسندگان

REFERENCES

- Bigdeli R, Younesi MR, Panahnejad E, Asgary V, Heidarzadeh S, Mazaheri H, et al. Association between thrombophilia gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss risk in the Iranian population. *Syst Biol Reprod Med*. 2018;**64**(4):274-82. PMID: 29658346 DOI: 10.1080/19396368.2018.1456576
- El Hachem H, Crepau V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int J Womens Health*. 2017;**9**:331-45. PMID: 28553146 DOI: 10.2147/IJWH.S100817
- Larsen EC, Christiansen OB, Kolte AM, Macklon N. New insights into mechanisms behind miscarriage. *BMC Med*. 2013;**11**:154. PMID: 23803387 DOI: 10.1186/1741-7015-11-154
- Hyde KJ, Schust DJ. Genetic considerations in recurrent pregnancy loss. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;**5**(3):a023119. PMID: 25659378 DOI: 10.1101/cshperspect.a023119
- Asgari N, Akbari MT, Zare S, Babamohammadi G. Positive association of Apolipoprotein E4 polymorphism with recurrent pregnancy loss in Iranian patients. *J Assist Reprod Genet*. 2013;**30**(2):265-8. PMID: 23292450 DOI: 10.1007/s10815-012-9897-5
- Hashemi M, Mokhtari M, Khazaeian S, Bahari G, Rezaei M, Nakhaee A, et al. Evaluation of HLA-G 14-bp ins/del and +3142G>C polymorphisms with susceptibility to recurrent spontaneous abortion. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2017;**56**(3):276-80. PMID: 28600033 DOI: 10.1016/j.tjog.2017.04.002
- Atik RB, Christiansen OB, Elson J, Kolte AM, Lewis S, Middeldrop S, et al. ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod Open*. 2018;**2018**(2):hoy004. PMID: 31486805 DOI: 10.1093/hropen/hoy004
- Rull K, Nagirnaja L, Ulander VM, Kelgo P, Margus T, Kaare M, et al. Chorionic gonadotropin beta-gene variants are associated with recurrent miscarriage in two European populations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;**93**(12):4697-706. PMID: 18782867 DOI: 10.1210/jc.2008-1101
- Zhang M, Xu J, Bao X, Niu W, Wang L, Du L, et al. Association between genetic polymorphisms in interleukin genes and recurrent pregnancy loss - a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;**12**(1):e0169891. PMID: 28103273 DOI: 10.1371/journal.pone.0169891
- Shi X, Xie X, Jia Y, Li S. Maternal genetic polymorphisms and unexplained recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *Clin Genet*. 2017;**91**(2):265-84. PMID: 27792840 DOI: 10.1111/cge.12910
- Kaiser J, Branch DW. Recurrent pregnancy loss: generally accepted causes and their management. *Clin Obstet Gynecol*. 2016;**59**(3):464-73. PMID: 27455203 DOI: 10.1097/GRF.0000000000000214
- de la Calle M, Usandizaga R, Sancha M, Magdaleno F, Herranz A, Cabrillo E. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;**107**(2):125-34. PMID: 12648856 DOI: 10.1016/s0301-2115(02)00305-6
- Xu Z, Zhang Y, Liu W, Liu Y, Su Y, Xing Q, et al. Polymorphisms of F2, PROC, PROZ, and F13A1 genes are associated with recurrent spontaneous abortion in Chinese Han women. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2018;**24**(6):894-900. PMID: 29363996 DOI: 10.1177/1076029617750487
- Jusic A, Balic D, Avdic A, Podanin M, Balic A. The association of factor V G1961A (factor V Leiden), prothrombin G20210A, MTHFR C677T and PAI-1 4G/5G polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Bosnian women. *Med Glas (Zenica)*. 2018;**15**(2):158-63. PMID: 29703881 DOI: 10.17392/948-18
- Bradley LA, Palomaki GE, Bienstock J, Varga E, Scott JA. Can factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes? Results from a targeted evidence-based review. *Genet Med*. 2012;**14**(1):39-50. PMID: 22237430 DOI: 10.1038/gim.0b013e31822e575b
- Mahmutbegovic E, Marjanovic D, Medjedovic E, Mahmutbegovic N, Dogan S, Valjevac A, et al. Prevalence of F5 1691G>A, F2 20210G>A, and MTHFR 677C>T polymorphisms in Bosnian women with pregnancy loss. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017;**17**(4):309-14. PMID: 28488549 DOI: 10.17305/bjbm.2017.1954
- Pereza N, Ostojic S, Kapovic M, Peterlin B. Systematic review and meta-analysis of genetic association studies in idiopathic recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril*. 2017;**107**(1):150-9.e2. PMID: 27842992 DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.007
- Barut MU, Bozkurt M, Kahraman M, Yildirim E, Imirzalioglu N, Kubar A, et al. Thrombophilia and recurrent pregnancy loss: the enigma continues. *Med Sci Monit*. 2018;**24**:4288-94. PMID: 29932168 DOI: 10.12659/MSM.908832
- Kurzawinska G, Barlik M, Drews K, Rozycka A, Seremak-Mrozikiewicz A, Ozarowski M, et al. Coexistence of ACE (I/D) and PAI-1 (4G/5G) gene variants in recurrent miscarriage in Polish population. *Ginekol Pol*. 2016;**87**(4):271-6. PMID: 27321098 DOI: 10.17772/gp/62203
- Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Klejowski A, Kurzawinska G, Lowicki Z, et al. Correlation between factor VII and PAI-1 genetic variants and recurrent miscarriage. *Ginekol Pol*. 2016;**87**(7):504-9. PMID: 27321098 DOI: 10.17772/gp/62203
- Beikzadeh B, Angaji SA, Abolhasani M. Association study between common variations in some candidate genes and prostate adenocarcinoma predisposition through multi-stage approach in Iranian population. *BMC Med Genet*. 2020;**21**(1):81. PMID: 32295536 DOI: 10.1186/s12881-020-01014-0
- Ahangari N, Doosti M, Mousavifar N, Attaran M,

- Shahrokhzadeh S, Memarpour S, et al. Hereditary thrombophilia genetic variants in recurrent pregnancy loss. *Arch Gynecol Obstet*. 2019;**300**(3):777-82. PMID: [31317253](#) DOI: [10.1007/s00404-019-05224-7](#)
23. Wingeyer SP, Aranda F, Udry S, Latino J, de Larranaga G. Inherited thrombophilia and pregnancy loss. Study of an Argentinian cohort. *Med Clin (Barc)*. 2019;**152**(7):249-54. PMID: [29523337](#) DOI: [10.1016/j.medcli.2017.12.019](#)
24. El Achi H, Awwad J, Abou Daya S, Halabi S, Damianos S, Mahfouz R. The association between cardiovascular disease gene mutations and recurrent pregnancy loss in the Lebanese population. *Mol Biol Rep*. 2018;**45**(5):911-6. PMID: [29974397](#) DOI: [10.1007/s11033-018-4237-1](#)
25. Lin M, Griessenauer CJ, Starke RM, Tubbs RS, Shoja MM, Foreman PM, et al. Haplotype analysis of SERPINE1 gene: risk for aneurysmal subarachnoid hemorrhage and clinical outcomes. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;**7**(8):e737. PMID: [31268630](#) DOI: [10.1002/mgg3.737](#)
26. Chen YL, Jia YM, Xie YT, Li Y, Fang WG, Tian XX. Association of single nucleotide polymorphisms in PAI-1 with breast cancer susceptibility and prognosis. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2016;**45**(8):533-9. PMID: [27510778](#) DOI: [10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2016.08.008](#)