

## +14bp/-14bp Polymorphism of HLA-G Gene in Iranian Women with Recurrent Spontaneous Abortions

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original research

#### Authors

Paknahad B.<sup>1</sup> BSc,  
Saadat Nia G.\* Ph.D,  
Mirza Ahmadi S.<sup>2</sup> Ph.D,  
Salehian P.<sup>3</sup> MD

#### How to cite this article

Paknahad B, Saadat Nia G, Mirza Ahmadi S, Salehian P. +14bp/-14bp Polymorphism of HLA-G Gene in Iranian Women with Recurrent Spontaneous Abortions. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2018;2(3):99-103.

\*Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

<sup>1</sup>Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

<sup>2</sup>Basic Sciences Faculty, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

<sup>3</sup>Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

#### Correspondence

Address: Sarem Women's Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111

Phone: +98 (21) 44670888

Fax: +98 (21) 44670432

gitasaadat@irost.ir

#### Article History

Received: March 17, 2017

Accepted: June 21, 2017

ePublished: August 15, 2018

### ABSTRACT

**Aims** Spontaneous abortion is one of the most common complications of pregnancy. Human leukocyte antigen G (*HLA-G*) is thought to have a mediating role in mother and fetus interactions. The aim of this study was to investigate the association of the +14bp/-14bp polymorphism of *HLA-G* gene with recurrent spontaneous abortion (RSA) among Iranian women.

**Materials & Methods** This case-control study was conducted on 50 patients with RSA and 50 normal women referred to Sarem women hospital (Tehran, Iran) during a six-month period from October 2012 to March 2013. After preparation of the blood samples and extraction of DNA, the exon 8 of *HLA-G* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and observed by polyacrylamide gel electrophoresis. Statistical analysis of data was done by Chi-square test using SPSS software.

**Findings** There was a significant difference in the frequency of homozygous genotypes between patient and control groups ( $p=0.034$ ). The homozygous genotypes of +14bp or -14bp were found more frequently in patients with RSA (60%) than the control group (34%). The odds ratio (OR) for homozygous genotypes relative to heterozygote genotype was found as 2.91.

**Conclusion** The frequencies of heterozygous and homozygous genotypes of the polymorphism, +14bp/-14bp of the *HLA-G* gene, differ between Iranian women with a history of RSA and healthy women.

**Keywords** 14+bp/14-bp Polymorphism; HLA-G Gene; Abortion, Habitual; HLA-G Antigens

### CITATION LINKS

[1] The prognostic value of anti paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births in couples with consecutive recurrent miscarriages [2] Maternal influences on placental development [3] Recurrent miscarriage: Aetiology, management and prognosis [4] A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage [5] Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome [6] Human reproductive failure II: Immunogenetic and interacting factors [7] Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population [8] HLA-G and immune tolerance in pregnancy [9] An update in recurrent spontaneous abortion [10] Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population [11] HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortion [12] Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion [13] A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells [14] Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients [15] Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions [16] Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy [17] Recurrent spontaneous abortions: An overview of genetic and non-genetic backgrounds [18] HLA-G and pregnancy [19] HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance [20] Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions

## پلی مورفیسیم +14bp/-14bp ژن HLA-G در میان زنان ایرانی با سابقه سقط مکرر خودبه خودی

بهار پاکنهاد BSc

پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

گیتا سعادت‌نیا PhD\*

پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

سینا میرزا احمدی PhD

دانشکده علوم پایه، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران

پیروز صالحیان MD

مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صرم، بیمارستان فوق تخصصی صرم، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** سقط خودبه خودی یکی از شایع‌ترین عوارض بارداری است. تصور می‌شود که آنتی‌ژن لوکوسیتی انسانی HLA-G دارای نقش میانجی‌گری در ارتباط بین مادر و جنین باشد. هدف این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسیم +14bp/-14bp ژن HLA-G با سابقه سقط مکرر خودبه خودی (RSA) در میان زنان ایرانی بود.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه مورد-شاهدی، در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۱ روی ۵۰ زن بیمار مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی و ۵۰ فرد با باروری طبیعی مراجعه‌کننده به بیمارستان فوق تخصصی صرم شهر تهران انجام شد. پس از تهیه نمونه‌های خونی و استخراج DNA، آگزون ۸ ژن HLA-G در هر دو گروه بیمار و کنترل با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکثیر و به وسیله الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪ بررسی شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون مجذور کای در نرم‌افزار SPSS انجام شد.

**یافته‌ها:** ژنوتیپ هموزیگوت +14bp و یا -14bp در ۶۰٪ افراد مبتلا به سقط‌های مکرر خودبه خودی مشاهده شد، در حالی که در گروه کنترل فقط ۳۴٪ افراد ژنوتیپ هموزیگوت را نشان دادند که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۳۴). نسبت شانس (OR) در مقایسه هموزیگوت به هتروزیگوت، ۲/۹۱ بود.

**نتیجه‌گیری:** پلی مورفیسیم +14bp/-14bp ژن HLA-G در میان زنان ایرانی از نظر فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت با سابقه RSA بین زنان بیمار و سالم تفاوت دارد.

**کلیدواژه‌ها:** پلی مورفیسیم +14bp/-14bp، ژن HLA-G، سقط مکرر خودبه خودی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۰۱

\*نویسنده مسئول: gitasaadat@irost.ir

### مقدمه

سقط خودبه خودی یکی از شایع‌ترین عوارض بارداری است. تعداد سه یا بیشتر ختم حاملگی خودبه خودی قبل از هفته ۲۰ یا حتی ۲۸ حاملگی سقط مکرر خودبه خودی (RSA) گفته می‌شود [1]. علل سقط مکرر خودبه خودی مولتی فاکتوریال است، ولی می‌توان دلایل آن را به دو دسته عمده جنینی و مادری تقسیم کرد. در مورد علل مادری می‌توان اختلالات انعقادی، اختلالات غدد درون ریز و نقص‌های اندومتریال را نام برد [2, 3]. از دیگر عوامل مهم، عوامل ایمنولوژیک هستند. در کل، علت حدود نیمی از موارد سقط مکرر، ناشناخته است که در این میان نقش عوامل ایمنولوژیک بیش از سایر عوامل مطرح است [4].

آنتی‌ژن لوکوسیتی انسانی (HLA-G) یک مولکول غیرکلاسیک از HLAهای رده I است که برخلاف HLA کلاسیک، پلی مورفیسیم کمی

دارد. یکی از پلی مورفیسیم‌های شناخته شده در این ژن، پلی مورفیسیم 14جفت‌بازی (14bp) در آگزون شماره ۸ است که با پایداری mRNA ژن HLA-G و الگوی پردازش متفاوت آن ارتباط دارد که در نتیجه میزان بیان و عملکرد HLA-G را در دوران بارداری تحت تاثیر قرار می‌دهد. مولکول HLA-G در ابتدا، روی سلول‌های تروفوبلاست تهاجمی مشاهده شده و تصور می‌شود نقش میانجی‌گری در ارتباط مادر و جنین دارد [4].

آنتی‌ژن لوکوسیتی انسانی (HLA-G) برای گیرنده‌های سلول‌های کشنده طبیعی (NK) یک لیگاند است و می‌تواند از فعالیت سلول‌های NK جلوگیری کند. در صورت محدودنشدن، به طور بالقوه می‌تواند به جنین آسیب وارد شود [5]. پروموتور HLA-G به شدت با خطر سقط خودبه خودی در ارتباط است، عدم تعادل در پروموتور از این رابطه علت و معلولی ممانعت به عمل می‌آورد [6].

آنتی‌ژن لوکوسیتی انسانی (HLA-G) یک سرکوب‌کننده بسیار قوی سیستم ایمنی است و در مدولاسیون سیستم ایمنی مادر در دوران بارداری و در نتیجه پذیرش جنین نیمه‌آلوژن توسط مادر بسیار مهم به نظر می‌رسد [7, 8, 4]. مطالعات روی پلی مورفیسیم HLA-G در بیماران مبتلا به سقط خودبه خودی در جوامع مختلف قومی، گزارش شده است [8-10, 4]. با این حال، نتیجه‌گیری در مورد ارتباط پلی مورفیسیم HLA-G با بارداری پاتولوژیک همچنان بحث‌انگیز باقی مانده است [10, 11].

پیشنهاد شده است که پلی مورفیسیم درج/حذف ۱۴جفت‌بازی (+14bp/-14bp) در منطقه ترجمه نشده ۳ ژن HLA-G در آگزون شماره ۸، رونویسی این ژن را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مطالعات نشان می‌دهد درج ۱۴جفت‌بازی در این ژن، با سطوح پایین HLA-G محلول در ارتباط است و این رابطه خطر سقط خودبه خودی را افزایش می‌دهد. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که زنان هموزیگوت برای درج ۱۴جفت‌بازی، دارای افزایش خطر ابتلا به سقط بوده‌اند و سطح HLA-G محلول پلاسما این افراد به طور معنی‌داری کمتر از افراد هتروزیگوت یا فاقد 14bp بوده است [11-14].

هدف این مطالعه، بررسی ارتباط پلی مورفیسیم +14bp/-14bp ژن HLA-G با سابقه RSA در میان زنان ایرانی بود.

### مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی روی زنان ایرانی مراجعه‌کننده به کلینیک سقط مکرر بیمارستان فوق تخصصی صرم شهر تهران در شش ماهه دوم سال ۱۳۹۱ انجام شد. از ۵۰ زن مبتلا به سقط مکرر خودبه خودی که نتایج بررسی کاربوتیپ، شرایط هیستروسکوپی، مقادیر هورمونی، عفونت‌ها و انعقاد خون آنها نرمال بود و ۵۰ زن با سابقه بارداری نرمال با حداقل ۲ فرزند، نمونه خون گرفته شد. از زنان شرکت‌کننده در مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه مطابق کدهای اخلاق پزشکی اخذ شد.

**استخراج DNA:** برای استخراج DNA از نمونه خون افراد از کیت استخراج Fermentas، شماره کاتالوگ K0512 (Thermo Fisher Scientific)، ایالات متحده) استفاده شد. ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر نمونه خون با ۴۰۰ میکرولیتر محلول لیزکننده مخلوط شد و ۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۶۵°C قرار گرفت، سپس ۶۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها افزوده و به حالت تعلیق درآورده شد و در ادامه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز روپی به یک لوله تازه انتقال داده شد و ۸۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب‌دهنده به آن اضافه شد و در دمای اتاق ۲-۱ دقیقه مخلوط شد. در مرحله بعد، نمونه با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد و پس از

ماهانه در ۷۸٪ این بیماران منظم و طبیعی بود و ۲۲٪ عادت ماهانه نامنظم داشتند که اکثر آنها با هتازگی دچار سقط شده بودند و یا پس از سقط بی‌نظمی در قاعدگی داشتند، در این رابطه با پزشک معالج مشورت شد تا این مسئله، خودبه‌خودی بودن سقط‌های این افراد را نقض نکند.

ژنوتیپ هموزیگوت در ۶۰٪ افراد مبتلا به سقط‌های مکرر خودبه‌خودی مشاهده شد، در حالی که در گروه کنترل فقط ۳۴٪ افراد ژنوتیپ هموزیگوت را نشان دادند که از نظر آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۳۴؛ جدول ۱). نسبت شانس (OR) در مقایسه هموزیگوت به هتروزیگوت ۲/۹۱ به‌دست آمد.

**جدول ۱)** فراوانی مطلق و نسبی (اعداد داخل پرانتز درصد هستند) ژنوتیپ‌های مختلف پلی‌مورفیسم 14bp/+14bp-14bp-14bp ژن HLA-G در زنان ایرانی با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی و زنان سالم بیمارستان صارم شهر تهران

ژنوتیپ	گروه بیماران	گروه کنترل
+14bp/+14bp (هموزیگوت)	۱۲ (۲۴/۰)	۷ (۱۴/۰)
-14bp/-14bp (هموزیگوت)	۱۸ (۳۶/۰)	۱۰ (۲۰/۰)
+14bp/-14bp (هتروزیگوت)	۲۰ (۴۰/۰)	۳۳ (۶۶/۰)
جمع	۵۰ (۱۰۰/۰)	۵۰ (۱۰۰/۰)

### بحث

در این مطالعه، پلی‌مورفیسم 14bp/+14bp-14bp ژن HLA-G در میان زنان ایرانی با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی (RSA) بررسی شد. تقریباً از هر ۳۰۰ بارداری در یک مورد سقط مکرر رخ می‌دهد، بنابراین یکی از شایع‌ترین عارضه‌ها در بارداری است. با اینکه بیش از ۸۰٪ افراد پس از سقط خودبه‌خودی، به‌صورت طبیعی باردار شده و نوزاد به‌طور سالم متولد می‌شود، اما احتمال تکرار سقط ۴۰ تا ۵۰٪ است [17]. اختلالات ایمنولوژیک از مهم‌ترین عوامل سقط مکرر خودبه‌خودی هستند.

عدم رد جنین به‌وسیله سیستم ایمنی مادر در بارداری‌های نرمال از موضوعات تحقیقاتی مورد توجه در جهان است. آنتی‌ژن بافتی HLA-G منشا مادری و جنینی دارد و به‌طور معمول در سطح سلول‌های سیتوتروفوبلاست که با سلول‌های مادری در تماس هستند یافت می‌شود و در مراحل مختلف تکامل و بقای جنین دخالت دارد. از آنجا که سلول‌های تروفوبلاست مرز بین جنین و مادر را تشکیل می‌دهند، پس HLA-G می‌تواند نقش محافظتی در برابر سیستم ایمنی مادر داشته باشد [2, 17]. بیان بسیار بالای HLA-G در سلول‌های مهاجم تروفوبلاست جفت دیده شده است و ممکن است در لانه‌گزینی جنین هم تأثیرگذار باشد. عملکرد متضاد HLA-G با دستگاه ایمنی می‌تواند مانع سقط خودبه‌خودی شود [18, 19].

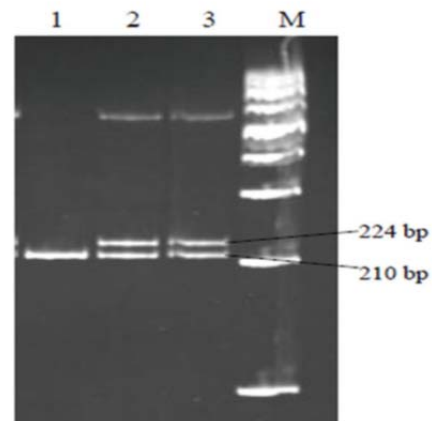
در مطالعه وید و همکاران [11]، ۶۱ زوج با بیش از ۳ بار سقط خودبه‌خودی با ۴۷ زوج سالم به‌عنوان کنترل با روش توالی‌یابی ژنی و RFLP مقایسه شدند. از نظر آماری تفاوتی در ژنوتیپ‌های این ژن در این افراد وجود نداشت، ولی پلی‌مورفیسم حذف 14bp-14bp در بیماران به‌صورت پراکنده وجود داشت. آلل هموزیگوت حذف 14bp در ۱۵٪ بیماران وجود داشت در حالی که این پلی‌مورفیسم در ۲٪ افراد گروه کنترل وجود داشت و پلی‌مورفیسم 14bp-14bp به‌صورت هتروزیگوت در گروه کنترل بیشتر بود. به نظر آنها، شانس موفقیت بارداری در افراد هتروزیگوت نسبت به مادران هموزیگوت بیشتر است، چرا که ممکن است افراد هتروزیگوت در غلظت ایزوفرم‌های mRNA و در نتیجه میزان پروتئین‌ها تنظیم بهتری داشته باشند. علاوه بر این، وید و همکاران [11] بیان کردند، غلظت پایین

تخلیه محلول رویی، رسوب DNA در ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱/۲ مولر NaCl حل شد و با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر اتانول سرد، رسوب DNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰°C- قرار داده شد، سپس ۳ تا ۴ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۰۰۰۰ rpm) و DNA خالص‌سازی شده در ۱۰۰ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز حل شد و برای انجام PCR به‌کار برده شد.

**واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR):** واکنش PCR با استفاده از

پرایمرهای-5' HLAG: GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTACC-3' و GE14: 5'-RHG4: GTGATGGGCTGTTTAAAGTGTACC-3' و GGAAGGAATGCAGTTCAGCATGA-3' [11, 15, 16]. ترکیبات واکنش برای هر نمونه شامل ۲۵ میکرولیتر محلول اصلی Fermentas 2X، شماره کاتالوگ: K0171 (Thermo Fisher Scientific، ایالات متحده)، یک میکروگرم DNA الگو و ۱۰ پیکومول از هر پرایمر و آب مقطر دوبار تقطیر استریل به‌اندازه موردنیاز تا حجم ۵۰ میکرولیتر بود. فرآیند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل شروع دناتوراسیون، یک سیکل سه‌دقیقه‌ای در دمای ۹۵°C، به‌دنبال آن ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه واسرشتی در دمای ۹۴°C، ۶۰ ثانیه اتصال در دمای ۶۴°C، ۱۲۰ ثانیه تکثیر در دمای ۷۲°C و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C انجام شد.

محصولات PCR، با استفاده از الکتروفورز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪ با استفاده از دستگاه ژل-داکیومننتیشن بررسی شدند. اندازه قطعه تکثیرشده در موارد دارای توالی ۱۴ نوکلئوتیدی، ۲۲۴ جفت‌باز و در موارد بدون ۱۴ نوکلئوتیدی، ۲۱۰ جفت‌باز بود که در ژل پلی‌آکریل‌آمید یا به‌صورت تک‌باز (هموزیگوت) یا دو باز (هتروزیگوت) ظاهر شدند. توالی مربوط به ۱۴ نوکلئوتیدی مورد نظر به‌صورت 5'-ATTGTTCATGCCT-3' گزارش شده است (شکل ۱) [14]. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون مجذور کای در نرم‌افزار SPSS انجام شد.



**شکل ۱)** الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۰٪ برای تعیین پلی‌مورفیسم 14bp/+14bp-14bp-14bp ژن HLA-G در میان زنان ایرانی با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی در بیمارستان صارم شهر تهران (چاهک ۱: هموزیگوت 14bp-، چاهک ۲ و ۳: هتروزیگوت 14bp/+14bp)

### یافته‌ها

میانگین سن بیماران ۳۱/۴۲±۴/۶۰ سال، بیشترین و کمترین سن نیز به ترتیب ۴۰ و ۲۲ سال بود. به‌طور میانگین این بیماران ۲/۸۲±۱/۲۶ سقط داشتند که حداکثر آن ۱۰ مورد و حداقل آن ۲ مورد بود. میانگین سن بلوغ در این افراد ۱۳/۰۰±۱/۱۰، بیشترین سن بلوغ آنها در ۱۶ سالگی و کمترین در ۱۰ سالگی بوده است. وضعیت عادت

داشته باشد [16]. در مطالعه دیگری در هندوستان ارتباط این پلی مورفیسم در ۱۴۳ زوج RSA و ۱۵۰ زوج به عنوان گروه کنترل بررسی شد ولی تفاوت معنی داری +14bp یا -14bp- یافت نشد، در حالی که یک افزایش میزان هموزیگوتی در حذف 14bp در زنان مبتلا به RSA یافت شد که می تواند باعث افزایش میزان HLA-G محلول شود [17].

یافته های این تحقیق حاکی از اختلاف معنی دار بین گروه بیمار و کنترل از نظر هتروزیگوتی و هموزیگوتی بود، به طوری که در گروه بیمار، افراد هتروزیگوت کمتری وجود دارد، هرچند که برای بیان ارتباط این پلی مورفیسم با سقط مکرر خودبه خودی بررسی های بیشتری لازم است. تفاوت های موجود در این نتایج با مطالعات دیگر نیز می تواند به دلیل تفاوت های نژادی باشد. بنابراین، لازم است که مطالعات بیشتری با استفاده از تعداد نمونه های بیشتر و قومیت های نژادی مختلف کشور جهت بررسی این ارتباط به عنوان یک عامل مستعدکننده RSA انجام شود.

### نتیجه گیری

پلی مورفیسم +14bp/-14bp ژن *HLA-G* در میان زنان ایرانی از نظر فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت و هموزیگوت با سابقه RSA بین زنان بیمار و سالم تفاوت دارد.

**تشکر و قدردانی:** از همکاران آزمایشگاه جنرال بیمارستان فوق تخصصی صرم کمال تشکر و قدردانی را داریم.

**تأییدیه اخلاقی:** از زنان شرکت کننده در این مطالعه رضایت نامه آگاهانه مطابق کدهای اخلاق پزشکی اخذ شد.

**تعارض منافع:** تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** بهار پاکنهاد (نویسنده اول)، نگارنده مقاله / پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۳۰٪)؛ گیتا سعادت نیا (نویسنده دوم)، نگارنده مقاله / روش شناس / پژوهشگر اصلی / نگارنده بحث (۳۰٪)؛ سینا میرزا احمدی (نویسنده سوم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر کمکی / تحلیل گر آماری (۱۰٪)؛ پیروز صالحیان (نویسنده چهارم)، نگارنده مقاله / پژوهشگر کمکی / نگارنده بحث (۳۰٪)

**منابع مالی:** این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر است که با استفاده از اعتبارات پژوهشگرده سلولی مولکولی و سلول های بنیادی صرم، انجام شد.

### منابع

- 1- Orgad S, Loewenthal R, Gazit E, Sadetzki S, Novikov I, Carp H. The prognostic value of anti paternal antibodies and leukocyte immunizations on the proportion of live births in couples with consecutive recurrent miscarriages. *Hum Reprod.* 1999;14(12):2974-9.
- 2- Aplin J. Maternal influences on placental development. *Semin Cell Dev Biol.* 2000;11(2):115-25.
- 3- Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman E, Laird S. Recurrent miscarriage: Aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update.* 2002;8(5):463-81.
- 4- Laird SM, Tuckerman EM, Cork BA, Linjawi S, Blakemore AI, Li TC. A review of immune cells and molecules in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod Update.* 2003;9(2):163-74.
- 5- Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB. Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens.* 2004;64(1):66-9.

ایزوفرم های محلول موجب نتایج منفی در IVF می شود و نتیجه گرفتند که پلی مورفیسم HLA-G با بارداری پاتولوژیک ارتباط دارد، با این وجود، این موضوع هنوز بحث برانگیز باقی مانده است.

وید و همکاران [5] در مطالعه دیگری نشان دادند که HLA-G یک لیگاند برای گیرنده های سلولی NK است و می تواند فعالیت سلول های NK را مهار کند، به طوری که در صورت محدود نشدن این فعالیت، به طور بالقوه قادر است به جنین آسیب وارد کند. علاوه بر این، آنها پلی مورفیسم +14bp/-14bp را بررسی کردند. این پلی مورفیسم در لقاح "در شیشه" نیز بررسی شد و ۲۹ زن مبتلا به RSA و ۹۳ زن بارور از نظر این ژنوتیپ مقایسه شدند. افرادی که برای +14bp هموزیگوت بودند به طور معنی داری با کاهش باروری و سقط مکرر و در نتیجه درمان ناموفق با روش IVF مواجه بودند. یافته های وید و همکاران نشان می دهد بیان HLA-G نقش تنظیم کننده ایمنی در مادر و جنین طی لانه گزینی و بارداری دارد. نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر تا حدودی مشابه مطالعاتی است که در دانمارک انجام شده است، به طوری که تعداد بیشتری از افراد هتروزیگوت برای پلی مورفیسم 14bp در گروه کنترل وجود داشت و افزایش خطر RSA را در زنان با پلی مورفیسم +14bp به خصوص به صورت هموزیگوت نشان می دهد. هرچند این مغایرت در یافته ها وجود داشت که در مطالعه حاضر ژنوتیپ -14bp- در گروه بیمار نیز افزایش یافته بود.

پاندی و همکاران [12] بر اساس یک مطالعه در ایالات متحده پیشنهاد داده اند پلی مورفیسم +14bp/-14bp در ناحیه ترجمه نشده 3' ژن *HLA-G* در آگزون ۸، رونویسی این ژن را تحت تاثیر قرار می دهد. مطالعات ایمونوتراپی با استفاده از پروب نشان می دهد +14bp در این ژن با سطوح پایین HLA-G محلول در ارتباط است و خطر سقط خودبه خودی را افزایش می دهد. برخی از مطالعات نشان داده اند که زنان هموزیگوت +14bp دارای افزایش خطر ابتلا به سقط خودبه خودی هستند و سطح HLA-G محلول پلاسمای این افراد نیز به طور معنی داری کمتر از افراد هتروزیگوت یا فاقد توالی ۱۴ جفت باز است. پلی مورفیسم 14bp در آگزون ۸ با پایداری mRNA ژن *HLA-G* و با الگوی پردازش متفاوت آن ارتباط دارد، در نتیجه میزان بیان و عملکرد HLA-G را در دوران بارداری تحت تاثیر قرار می دهد [10, 15].

در مطالعه تریپاتی و همکاران [16] در هندوستان فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت +14bp/-14bp در زنان RSA از نظر آماری افزایش یافته بود. در مطالعه دیگری که توسط بیان و همکاران [20] در چین انجام شد، ژنوتیپ ۱۰۹ زن بارور به عنوان گروه کنترل و ۷۹ زن با سابقه RSA تفاوت معنی داری در مقدار فراوانی آلل های +14bp یا -14bp بین گروه کنترل و افراد RSA نشان نداد، اما آلل +14bp در زنان RSA نسبت به گروه کنترل بیشتر دیده شد و افراد بیمار اغلب ژنوتیپ هتروزیگوت +14bp/-14bp- داشتند. مطالعه دیگری در چین توسط ژو و همکاران [10] انجام شد بررسی ۲۴ فرد RSA و ۸۸ فرد نرمال نشان داد فراوانی ژنوتیپ هتروزیگوت +14bp/-14bp به طور معنی داری در بیماران RSA در مقایسه با افراد نرمال بیشتر است، این نتایج با نتایج به دست آمده از دانمارک مغایر بود [11].

تفاوت های مشاهده شده در نتایج می تواند به دلیل تفاوت های نژادی باشد. همچنین مشاهده شده است که مقدار رونوشت آلل *HLA-G* با اضافه شدن 14bp به طور معنی داری نسبت به مواردی که آلل دارای حذف 14bp است، کاهش می یابد. مشاهده شدن آلل با اضافه شدگی 14bp در گروه RSA امکان دارد که با میزان mRNA ایزوفرم های HLA-G و یا احتمالاً با غلظت این پروتئین ارتباط



procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.

14- Shankarkumar U, Shankarkumar A, Chedda Z, Ghosh K. Role of 14-bp deletion/insertion polymorphism in exon 8 of the HLA-G gene in recurrent spontaneous abortion patients. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(3):143-6.

15- Aruna M, Sirisha PV, Andal Bhaskar S, Tarakeswari S, Thangaraj K, Reddy BM. Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2011;77(2):131-5.

16- Tripathi P, Abbas A, Naik S, Agrawal S. Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens.* 2004;64(6):706-10.

17- Meka A, Reddy BM. Recurrent spontaneous abortions: An overview of genetic and non-genetic backgrounds. *Int J Hum Genet.* 2006;6(2):109-17.

18- Le Bouteiller P, Mallet V. HLA-G and pregnancy. *Rev Reprod.* 1997;2(1):7-13.

19- Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas Freiss N. HLA-G molecules: From maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol.* 2003;81:199-252.

20- Yan WH, Lin A, Chen XJ, Dai MZ, Gan LH, Zhou MY, et al. Association of the maternal 14-bp insertion polymorphism in the HLA-G gene in women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2006;68(6):521-3.

6- Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure II: Immunogenetic and interacting factors. *Hum Reprod Update.* 2001;7(2):135-60.

7- Takakuwa K, Adachi H, Hataya I, Ishii K, Tamura M, Tanaka K. Molecular genetic studies of HLA-DRB1 alleles in patients with unexplained recurrent abortion in the Japanese population. *Hum Reprod.* 2003;18(4):728-33.

8- Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C. HLA-G and immune tolerance in pregnancy. *Official Pub Fed Am Soci Exper Biol J.* 2005;19(7):681-93.

9- Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;272(2):95-108.

10- Xue S, Yang J, Yao F, Xu L, Fan L. Recurrent spontaneous abortions patients have more -14 bp/+14 bp heterozygotes in the 3'UT region of the HLA-G gene in a Chinese Han population. *Tissue Antigens.* 2007;69(Suppl 1):153-5.

11- Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM, Kruse C, Christiansen OB. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens.* 2002;60(2):122-32.

12- Pandey MK, Thakur S, Agrawal S. Lymphocyte immunotherapy and its probable mechanism in the maintenance of pregnancy in women with recurrent spontaneous abortion. *Arch Gynecol Obstet.* 2004;269(3):161-72.

13- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out