

بررسی ارتباط سه پلی مورفیسیم فاکتور ۵ انعقادی و سندرم سقط مکرر

راحله ترابی (M.Sc.)^۱، مهیار استاد کرم پور (M.Sc.)^۲، افسانه محمدزاده (M.D.)^۳، سهیلا عارفی (M.D.)^۴، محمد کرامتی پور (M.D.)^۵، سعید زارعی (M.D.)^۶، حجت زراعتی (Ph.D.)^۷، محمود جدی تهرانی (Ph.D.)^۸

- ۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
- ۲- پژوهشکده آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران
- ۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران
- ۴- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران
- ۵- گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: یکی از مهمترین فاکتورهای مطرح در ایجاد ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط مکرر، پلی مورفیسیم های فاکتور ۵ انعقادی است. ارتباط بین پلی مورفیسیم FV Leiden و ترومبوفیلی در زنان مبتلا به سقط مکرر، تاکنون در مطالعات بسیاری بررسی و نتایج متفاوت و گاه متناقضی بدست آمده است. دو پلی مورفیسیم جدید FV A4070G و FV A5279G، که باعث نقص فاکتور ۵ انعقادی می شوند، کمتر مورد توجه و مطالعه بوده اند. این مطالعه به منظور بررسی اثر این سه پلی مورفیسیم بر میزان افزایش خطر ابتلا به سندرم سقط مکرر در زنان ایرانی انجام شد.

روش بررسی: ۱۰۰ بیمار با حداقل سابقه دو بار سقط، به عنوان گروه بیمار و ۱۰۰ خانم بدون سابقه سقط و با حداقل سابقه دو زایمان موفق، به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. برای بررسی سه پلی مورفیسیم FV Leiden، FV A4070G و FV A5279G، واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) همراه با استفاده از آنزیم های محدودکننده (PCR-RFLP) طراحی شد. به منظور تجزیه و تحلیل آماری از آزمون های من-ویتی، آزمون همبستگی اسپیرمن، مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره و چنگانه به روش پس رو استفاده شد.

نتایج: با توجه به نسبت افراد واجد موتاسیون FV Leiden در دو گروه (۱۳٪ در گروه بیمار و ۴٪ در گروه کنترل)، احتمال سقط مکرر در بیماران واجد این پلی مورفیسیم بیشتر بود (نسبت خطر: ۳/۵۸۶ و ۱۱/۴۱۲-۱/۱۲۷ CI: ۹۵٪). برای پلی مورفیسیم های FV A4070G و FV A5279G به ترتیب ۱۴ نفر (۱۴٪) و ۳۷ نفر (۳۷٪) از افراد گروه بیمار واجد این دو پلی مورفیسیم بودند. در مقابل از ۱۰۰ فرد گروه کنترل، به ترتیب تنها ۴ نفر (۴٪) پلی مورفیسیم FV A4070G و ۷ نفر (۷٪) پلی مورفیسیم A5279G را داشتند. احتمال سقط مکرر در بیماران واجد این دو پلی مورفیسیم نیز در مقایسه با گروه کنترل بیشتر بود، به ترتیب (نسبت خطر: ۳/۲۷۳ و ۱۰/۵۲۳-۱/۰۱۸ CI: ۹۵٪) و (نسبت خطر: ۷/۸۰۳ و ۳/۲۷۳-۱۸/۶۰۳ CI: ۹۵٪). نسبت افراد دارای دو یا سه موتاسیون در دو گروه بیمار و کنترل نشان داد که بین دو پلی مورفیسیم FV Leiden و FV A4070G، ارتباط متقابل دیده می شود. با بررسی اثر همزمان سه پلی مورفیسیم بر شانس وقوع سقط مکرر، به کمک آزمون رگرسیون لجستیک چنگانه به روش پس رو مشخص شد که با بررسی دو پلی مورفیسیم FV A4070G و FV A5279G، می توان اثر همزمان هر سه موتاسیون را روی شانس وقوع سقط مکرر ارزیابی کرد.

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه هر سه پلی مورفیسیم ژن فاکتور ۵ انعقادی با افزایش خطر سقط مکرر همراه است. بین دو پلی مورفیسیم FV Leiden و FV A4070G، ارتباط متقابل وجود دارد. با بررسی دو پلی مورفیسیم FV A4070G و FV A5279G، می توان اثر همزمان هر سه موتاسیون را روی شانس وقوع سقط مکرر ارزیابی کرد و لذا بررسی وجود این پلی مورفیسیمها در زنان مبتلا به سقط مکرر توصیه می گردد.

کلید واژگان: پلی مورفیسیم ژنی، ترومبوفیلی، سندرم سقط مکرر خودبخودی، فاکتور ۵ انعقادی، FV A5279G، FV A4070G، FV Leiden

مسئول مکاتبه: دکتر محمود جدی تهرانی، پژوهشکده آنتی بادی مونوکلونال، پژوهشگاه فن آوری های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، انتهای بلوار داخل دانشگاه، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۱۷۷-۱۹۶۱۵.

پست الکترونیک: mahjed@avicenna.ac.ir

دریافت: ۸۷/۸/۵ پذیرش: ۸۷/۱۰/۱۹

The Relationship between Polymorphisms of Blood Coagulation Factor V Gene and Recurrent Pregnancy Losses

Torabi, Raheleh (M.Sc.)¹; Ostadkarampour, Mahyar (M.Sc.)²; Mohammadzadeh, Afsaneh (M.D.)³; Arefi, Soheila (M.D.)³; Keramatipour, Mohammad (M.D., Ph.D.)⁴; Zarei, Saeed (M.D.)²; Zeraati, Hojjat (Ph.D.)⁵; Jeddi-Tehrani, Mahmood* (Ph.D.)²

1. Faculty of Science, Tehran Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.

3. Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.

4. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: Polymorphisms of coagulation factor V gene are the most important suspected causes of thrombophilia in women with recurrent pregnancy losses (RPL). In this study the association between three polymorphisms of factor V (FV Leiden, FV A4070G & FV A5279G) and RPL are sought in Iranian women.

Materials & Methods: In this case-control study, 100 female patients with at least two recurrent abortions were selected as the cases, and 100 healthy women with a history of two successful deliveries as the controls. Peripheral blood samples were collected and DNA was extracted. PCR-RFLP method was used for genotyping the samples.

Results: Regarding the prevalence of FV Leiden mutation in the cases and the controls, 13% and 4% respectively, the chances for recurrent pregnancy losses were more than 3.5 times higher in individuals with this polymorphism (OR: 3.586, 95% CI: 1.127–11.412). The frequencies of FV A4070G and FV A5279G were 14% and 37% in the case and 4% and 7% in the control groups, respectively and the chances for RPL were higher in cases with these two polymorphisms. The proportion of cases with two or three mutations in the gene in comparison with the controls, showed a significant correlation between FV Leiden and FV A4070G polymorphisms. Statistical analysis of the simultaneous effects of the three polymorphisms for RPL showed that evaluation of FV A4070G and FV A5279G could help assess the chances of the three mutations for RPL.

Conclusion: The three polymorphisms in coagulation V gene are accompanied with increased risks for RPL. Evaluation for the three polymorphisms is suggested in the work up of women with RPL.

Key Words: Blood coagulation factor V, FV A4070G, FV A5279G, FV Leiden, Polymorphism, Recurrent Pregnancy Loss, Thrombophilia.

Corresponding Author: Mahmood Jeddi-Tehrani, Monoclonal Antibody Research Center, Avicenna Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran. P.O. Box 19615-1177
E-mail: mahjed@avicenna.ac.ir

Received: Oct 26, 2008; **Accepted:** Jan 8, 2009

زمینه و هدف

سندرم سقط مکرر خودبخودی (RPL)^۱ اغلب به صورت دو یا بیش از دو سقط متوالی پیش از هفته ۲۰ بارداری تعریف می‌شود (۱،۲). سقط مکرر بر دو نوع اولیه ثانویه است. در نوع اولیه، بلافاصله چند سقط متوالی رخ می‌دهد ولی در نوع ثانویه، پس از یک بارداری موفق، سقط‌های متوالی آغاز می‌شوند (۴-۱). اغلب از سقط مکرر به عنوان بیماری چند عاملی نام برده می‌شود که یکی از این عوامل، ترومبوز است. به نظر می‌رسد ترومبوز می‌تواند در مویرگ‌های جفت باعث اختلال در روند گردش خون بین مادر و جنین شده و نهایتاً منجر به سقط جنین گردد. از طرف دیگر در طول بارداری، در نتیجه افزایش پیش فاکتورهای انعقادی و کاهش سطح عوامل ضد انعقادی به طور طبیعی حالت پیش انعقادی ایجاد می‌شود (۴،۳). اخیراً با مطالعات صورت گرفته مشخص شده که وجود زمینه ژنتیکی ترومبوفیلی با سقط مکرر ارتباط دارد. ارتباط بین سقط مکرر و ترومبوفیلی، موضوع بسیار بحث برانگیزی است که مطالعات بسیاری روی آن صورت گرفته و نتایج متناقضی در تأیید و رد آن بدست آمده است (۳). فاکتور ۵ انعقادی، نقشی اساسی در تنظیم هموستاز مسیرهای انعقادی بر عهده دارد. جهش نقطه‌ای G1691A در ژن فاکتور ۵ انعقادی که فاکتور ترومبوفیلیک لیدن (FVL)^۲ نامیده می‌شود و باعث حذف یک جایگاه شکست در فاکتور ۵ انعقادی شده و در نتیجه با اثر بر عملکرد کمپلکس ترومبیناز، باعث مقاومت فاکتور ۵ انعقادی به پروتئین C فعال شده (APCR)^۳ می‌شود (۲۹)، با سقط مکرر ارتباط دارد (۳،۵). پلی مورفیسم FV Leiden منجر به افزایش خطر سقط جنین در افراد ناقل این پلی مورفیسم تا سه برابر (از ۶ تا ۱۶٪) افراد سالم می‌شود (۳). گرچه مطالعات

بسیاری افزایش خطر سقط مکرر را در زنان دارای این پلی مورفیسم تأیید کرده‌اند (۱۶-۵، ۳)، ولی در برخی مطالعات ارتباط این پلی مورفیسم با سقط مکرر رد شده است (۲۵-۱۷).

پلی مورفیسم His1299Arg فاکتور ۵ انعقادی، که با نام هاپلوتیپ HR2 (R2) نیز شناخته می‌شود، در نتیجه جهش A4070G در ژن فاکتور ۵ انعقادی ایجاد می‌شود. این پلی مورفیسم با اثر بر روی کمپلکس ترومبیناز به واسطه افزایش فرمی از فاکتور ۵ انعقادی (FVa1) که به شکل محدودی به فسفولیپید متصل می‌شود، باعث کاهش فعالیت فاکتور ۵ و کاهش غلظت آنتی‌ژن فاکتور ۵ فعال می‌گردد (۳۱-۲۶، ۲۳، ۱۱). افراد حامل پلی مورفیسم FV A4070G فاکتور ۵ انعقادی دارای APCR و افزایش خطر ترومبوز و ریدی هستند. بنابراین، اثر کلی این پلی مورفیسم به صورت فاکتور خطر ترومبوتیک است (۳۰، ۲۶-۳۲). بین پلی مورفیسم FV A4070G با دیگر پلی مورفیسم‌های فاکتور ۵ انعقادی، از نظر آماری پیوستگی قابل قبول وجود دارد. در مطالعه‌ای روی بیماران مبتلا به ترومبوز و ریدی، مشاهده شد که حاملان پلی مورفیسم FV A4070G، از سطح فاکتور ۵ انعقادی در حال گردش کمتری برخوردار هستند (۳۳). افزایش خطر ابتلا به ترومبوز و ریدی در افراد حامل این پلی مورفیسم، تا ۱/۸ برابر خواهد بود (۱۶). با این حال، به طور کلی ارتباط پلی مورفیسم FV A4070G با افزایش خطر ابتلا به ترومبوز و ریدی و کاهش سطح فاکتور ۵ انعقادی، تأیید نشده است. داشتن پلی مورفیسم FV A4070G با APCR و افزایش سطح ایزوفرم ترومبوژنیک فاکتور ۵ انعقادی (FV1) (فاکتور ۵ انعقادی دارای دو ایزوفرم FV1 و FV2 است که متناسب با شرایط، نسبت یکی به دیگری در پلاسما تغییر می‌کند) در پلاسما نیز ارتباط دارد (۲۶). گزارش شده که این پلی مورفیسم خطر

1- Recurrent Pregnancy Loss

2- Factor V Leiden

3- Activated protein C resistance

روش بررسی

۱- انتخاب گروه بیماران و گروه کنترل: ۱۰۰ نفر از بین زنان مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی (داشتن سابقه حداقل دو یا بیش از دو سقط مکرر) مراجعه کننده در سال ۱۳۸۵ به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا انتخاب شدند. معیار خروج از مطالعه، وجود ناهنجاری‌های آناتومیک، اختلالات هورمونی، بیماری‌های خودایمنی و عفونت تایید شده دستگاه تناسلی بود. ۱۰۰ خانم بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد انتخاب شدند. سن گروه بیماران بین ۴۵-۲۵ (به طور متوسط ۳۳ سال) و تعداد سقط‌های مکرر بین ۶-۳ (به طور متوسط ۴) بود. در انتخاب گروه کنترل سعی شده است که از نظر مشخصات دموگرافیک با گروه بیمار تفاوت چندانی نداشته باشند. تعداد بارداری‌های موفق افراد این گروه بین ۴-۲ (به طور متوسط ۲) عدد بود. به منظور نمونه‌گیری خون و انجام طرح، از کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی- ابن سینا، مجوز لازم اخذ و از تمام افراد مورد مطالعه، رضایت‌نامه آگاهانه دریافت شد.

۲- بررسی ژنوتیپ: از هر فرد 5ml خون در حضور ضد انعقاد EDTA دریافت و استخراج DNA به روش Salting Out با استفاده از پروتئیناز K انجام شد. ابتدا واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) برای هر جفت پرایمر بهینه‌سازی شد (جدول ۱). مواد مؤثره در هر واکنش PCR شامل $2/5\ \mu\text{l}$ بافر PCR (10X) (pH=۸/۳)، $1\ \mu\text{l}$ از هر دو جفت پرایمر ($10\ \mu\text{M}$)، $0/2\ \mu\text{l}$ Taq DNA، $1\ \mu\text{l}$ پلی‌مرز ($5\ \text{U}/\mu\text{l}$) (Roche, Germany)، $1\ \mu\text{l}$ dNTP ($10\ \text{mM}$) و $1\ \mu\text{l}$ DNA بود. برای هر ست پرایمر FV Leiden، FV A4070G و FV A5279G، به ترتیب $2\ \mu\text{l}$ ، $4\ \mu\text{l}$ و $8\ \mu\text{l}$ MgCl_2 ($20\ \text{mM}$) در حجم نهایی $25\ \mu\text{l}$

ترمیموز وریدی را در ناقلان آل FV Leiden افزایش می‌دهد. در برخی مطالعات دیگر، ارتباطی بین پلی مورفیسم FV A4070G و سقط مکرر دیده نشده، ولی مشاهده شده که توارث همزمان پلی مورفیسم FV A4070G و FV Leiden می‌تواند باعث افزایش خطر سقط مکرر گردد (۲۲). در تحقیقات دیگری نیز نشان داده شده که هموزیگوت بودن برای پلی مورفیسم FV A4070G می‌تواند خطر سقط مکرر را افزایش دهد (۵).

پلی مورفیسم جدیدی نیز در دومین A3 در ژن فاکتور ۵ انعقادی به نام FV A5279G گزارش شده که باعث جایگزینی اسید آمینه تیروزین با سیتوزین در جایگاه اسید آمینه ای ۱۷۰۲ می‌شود (۲۹، ۳۴). در ناقلان این پلی مورفیسم تغییری در بیان mRNA ژن فاکتور ۵ ایجاد نمی‌شود ولی به دلیل این جایگزینی اسید آمینه ای، باعث کاهش پایداری پروتئین می‌شود و لذا دارای سطح فاکتور ۵ انعقادی کاهش یافته‌اند (۲۹). کمبود فاکتور ۵ انعقادی به علت این پلی مورفیسم، می‌تواند منجر به ایجاد خطر ترومبوتیک در خانواده‌ها گردد (۳۵-۳۳، ۲۹). مطالعاتی وجود دارند که ارتباط این پلی مورفیسم را با افزایش خطر ترومبوز و نقص فاکتور ۵ انعقادی و سندرم سقط مکرر تأیید می‌کنند (۳۲، ۲۳). ولی به طور کلی، مطالعات بسیار اندکی روی ارتباط دو پلی مورفیسم FV A4070G و FV A5279G و سقط مکرر انجام شده است. لذا با توجه به اهمیت و نقش فاکتور ۵ در هموستاز انعقاد خون، اثرات پلی مورفیسم‌های آن در افزایش خطر ترومبوز و نیز ارتباط ترمبوز با افزایش احتمال سقط مکرر، در مطالعه حاضر ما ارتباط سه پلی مورفیسم فاکتور ۵ انعقادی (FV Leiden، FV A4070G و FV A5279G) را با سقط مکرر بررسی و مورد مطالعه قرار می‌دهیم.

یافته، جایگاه شکست برای آنزیم Acc1 (New England Biolabs) از بین رفته و بدون شکست باقی می ماند؛ در حالی که در آلل طبیعی با ایجاد شکست، دو قطعه ۱۵bp و ۱۰۵bp ایجاد می شود. برای بررسی محصولات PCR پس از RFLP، از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکرلامید با رنگ آمیزی نیترا ت نقره برای مقایسه دقیق طول باندها استفاده شد. با توجه به نتایج مشاهده شده بر روی ژل پلی آکرلامید، ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی مورفیسم مشخص شد.

۳- بررسی های آماری: اطلاعات حاصل توسط نرم افزار SPSS (Ver.13.0) بررسی شد. چگونگی وقوع این پلی مورفیسم به سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون من-ویتنی بررسی شد. آزمون همبستگی اسپیرمن نیز برای بررسی امکان وجود ارتباط متقابل بین این سه پلی مورفیسم انجام شد. نتایج برای این دو آزمون با $p < 0.05$ معنی دار تلقی گردیدند. جهت بررسی اثر هر پلی مورفیسم بر وقوع سقط مکرر، از مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره استفاده شد. سپس جهت بررسی اثر همزمان موتاسیونها بر شانس وقوع سقط مکرر، از مدل رگرسیون لجستیک چندگانه به روش پس رو بکار رفت.

نتایج

با توجه به نتایج مشاهده شده بر روی ژل پلی آکرلامید، افراد به سه دسته سالم، هتروزیگوت و هموزیگوت برای هر پلی مورفیسم تقسیم بندی شدند (تصاویر ۱-۳). در گروه بیماران برای سه پلی مورفیسم FV A5279G و FV A4070G، FV Leiden به ترتیب ۱۲، ۱۲ و ۳۶ نفر فرد هتروزیگوت و ۱، ۲ و ۱ فرد هموزیگوت دیده شد. در مقابل در گروه کنترل تنها ۴، ۴ و ۷ فرد هتروزیگوت مشاهده و هیچ فرد هموزیگوتی تشخیص داده نشد. فراوانی افراد واجد هر یک از سه

استفاده شد. سپس PCR برای هر سه جفت پرایمر برای بررسی سه پلی مورفیسم فاکتور ۵، به ترتیب ذیل بر روی نمونه های DNA دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوره کردن در 94°C به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA به ترتیب ذیل تکثیر یافتند: برای پلی مورفیسم FV Leiden، تعداد ۴۰ سیکل (94°C به مدت ۳۰ ثانیه، $50/7^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه)، برای پلی مورفیسم FV A4070G، تعداد ۳۵ سیکل (91°C به مدت ۱ دقیقه، 60°C به مدت ۱ دقیقه و 71°C به مدت ۲ دقیقه) و برای پلی مورفیسم FV A5279G، تعداد ۳۵ سیکل (94°C به مدت ۳۰ ثانیه، 64°C به مدت ۳۰ ثانیه و 72°C به مدت ۳۰ ثانیه) و به دنبال آنها مرحله طویل سازی نهایی، 72°C به مدت ۷ دقیقه انجام شد.

صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز برای محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ پس از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید، زیر نور UV تأیید شد. RFLP بر روی محصولات PCR پرایمرهای سه پلی مورفیسم FV G1691A (FV Leiden)، FV A4070G و FV A5279G به ترتیب توسط آنزیم های محدودکننده Rsa1، Mnl1 و Acc1 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) انجام شد. محصول PCR برای پرایمرهای FV Leiden، باندی ۱۴۰bp است که برای آلل نرمال، دو جایگاه شکست و برای آلل جهش یافته، یک جایگاه دارد. پس از RFLP توسط آنزیم Mnl1 (New England Biolabs)، آلل نرمال سه قطعه ۶۹bp، ۳۶bp و ۷۱bp و آلل جهش یافته دو قطعه ۶۹bp و ۷۱bp را ایجاد می کنند. در مورد FV A4070G، محصول PCR باندی ۱۵۶۸bp است که پس از RFLP با آنزیم Rsa1 (New England Biolabs)، آلل 4070A، دو باند ۱۴۳۸bp و ۱۳۰bp و آلل 4070G، سه باند ۸۶۲bp، ۵۷۶bp و ۱۳۰bp را ایجاد می کند. باند محصول PCR برای FV A5279G نیز ۱۲۰bp بوده که در آلل جهش

جدول ۱- بررسی ژنوتیپ برای سه پلی مورفیسم فاکتور ۵ انعقادی

محصول RFLP	آنزیم محدودکننده	محصول PCR	توالی پرایمرها	پلی مورفیسم
(69,36,35) *	Mnl1	140bp	F-5'-CTT CAA GGACAA AAT ACC TG-3'	FV Leiden
(71,69) **			R-5'-TGC CCA GTG CTT AACAAG ACC A-3'	
(1438,130) *	Rsal	1568bp	F-5'-TGCTCCTTATCTCCGAGGACC-3'	FV A4070G
(862,576,130)**			R-5'-CTCTGGAGGAGTTGATGTTTGTCC-3'	
(105,15)*	Acc1	120bp	F-5'-CTGTCTGGGCTTGGGTCT-3'	FV A5279G
(120)**			R-5'-GAAATAACCCCGACTCTTC-3'	

* آلل نرمال، ** آلل موتانت.

FV A4070G و FV Leiden ۴ نفر دارای دو پلی-مورفیسم FV A5279G و FV Leiden ۲ نفر دارای دو پلی-مورفیسم FV A5279G و FV A4070G و ۳ نفر واجد هر سه موتاسیون بودند. در گروه کنترل تنها ۱ فرد دارای FV A5279G و FV Leiden مشاهده شد. با استفاده از مدل لجستیک چندگانه به روش پسرو مشخص شد که در صورت وجود همزمان این سه پلی-مورفیسم در یک فرد، دو پلی-مورفیسم FV A4070G (OR: ۳/۹۲۸, 95% CI: ۱/۱۷۷-۱۳/۱۱۱) و FV A5279G (OR: ۸/۲۴۶, 95% CI: ۳/۴۳۶-۱۹/۷۹۴) هر کدام با اثری مجزا باعث افزایش ریسک وقوع سقط مکرر می‌شوند و FV Leiden (به علت ایجاد اثر همراه با FV A4070G) از مدل خارج می‌شود. بدین معنا که شانس وقوع سقط مکرر را می‌توان با ارزیابی دو پلی-مورفیسم FV A4070G و FV A5279G مشخص کرد.

براساس آزمون همبستگی اسپیرمن، تنها بین دو پلی-مورفیسم FV A4070G و FV Leiden ارتباط متقابل دیده شد ($p < 0/001$)

جدول ۲- شیوع سه پلی-مورفیسم فاکتور ۵ انعقادی در بیماران مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی و گروه شاهد و میزان افزایش شانس وقوع سقط مکرر به واسطه وجود هر یک از پلی-مورفیسمها در یک فرد و حدود اعتماد آن

پلی مورفیسم	مورد		شاهد		OR (CI 95%)*	p-value*
	تعداد	درصد	تعداد	درصد		
FV Leiden	۱۳	۱۳	۴	۴	۳/۵۶ (۱/۱۲۷-۱۱/۴۱۲)	< 0/05
FV A4070G	۱۴	۱۴	۴	۴	۳/۲۷۳ (۱/۰۱۸-۱۰/۵۲۳)	< 0/05
FV A5279G	۲۷	۲۷	۷	۷	۷/۸۰۳ (۳/۲۷۳-۱۸/۶۰۳)	< 0/001

* نتایج حاصل از بررسی داده‌ها به روش مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره 0/05 < p-value معنادار تلقی می‌گردد.

پلی مورفیسم با گروه سالم، دارای تفاوت معنی‌داری بوده و هر سه پلی-مورفیسم با افزایش خطر سندرم سقط مکرر ارتباط دارند: ($p\text{-value}_{FV\ Leiden} = 0/022$)، ($p\text{-value}_{FV\ A4070G} = 0/036$) و ($p\text{-value}_{FV\ A5279G} < 0/001$) (جدول ۲).

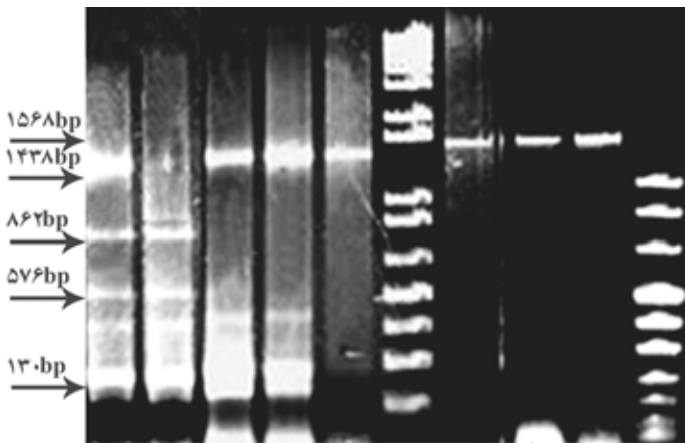
همچنین با ادغام دو گروه هتروزیگوت و هموزیگوت، گروهی تحت عنوان گروه واجد موتاسیون بدون توجه به نوع موتاسیون، ایجاد شده و با استفاده از مدل لجستیک رگرسیون تک متغیره، به تفکیک هر سه موتاسیون ملاحظه شد که p-value برای هر سه معنی‌دار بوده و شانس وقوع سقط مکرر به علت حضور هر پلی-مورفیسم محاسبه شد (جدول ۳). محاسبات نشان داد شانس وقوع سقط مکرر در صورت وجود پلی-مورفیسم FV Leiden ۳/۵۶ برابر پلی-مورفیسم FV A4070G ۳/۲۷۳ برابر پلی-مورفیسم FV A5279G ۷/۸۰۳ برابر ($OR\ FV\ Leiden: 3/56, 95\% CI: 1/127-11/412$)، ($OR\ FV\ A4070G: 3/273, 95\% CI: 1/018-10/523$) و پلی-مورفیسم FV A5279G ۷/۸۰۳ برابر ($OR\ FV\ A5279G: 7/803, 95\% CI: (3/273$ می‌شود.

از ۱۰۰ فرد بیمار، ۱۰ نفر واجد هر دو موتاسیون

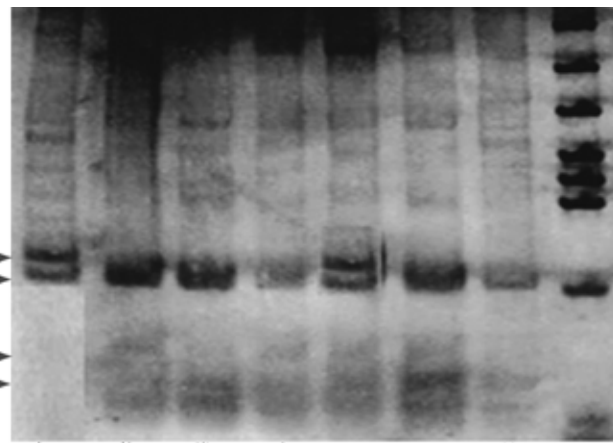
جدول ۲- مقایسه فراوانی سه پلی-مورفیسم فاکتور ۵ انعقادی و ارتباط آنها با سقط مکرر در افراد مبتلا به سقط مکرر (n=۱۰۰) و افراد بدون سقط مکرر (n=۱۰۰)

پلی مورفیسم	نرمال		هتروزیگوت		هموزیگوت		p-value*
	شاهد	نمونه	شاهد	نمونه	شاهد	نمونه	
FV Leiden	۸۷%	۹۶%	۱۲%	۴%	۱%	۰	0/022
FV A4070G	۸۶%	۹۶%	۱۲%	۴%	۲%	۰	0/036
FV A5279G	۶۳%	۹۳%	۳۶%	۷%	۱%	۰	< 0/001

* نتایج حاصل از بررسی داده‌ها به روش من-ویتنی $p < 0/05$ معنی‌دار تلقی می‌گردد.



شکل ۲- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم FV A4070G: ۱: هتروزیگوت (باند های ۱۵۶۸، ۸۶۲، ۵۷۶، ۱۲۳۸ و ۱۳۰)، ۲: هموزیگوت (باند های ۸۶۲bp، ۵۷۶ و ۱۳۰)، ۳-۵: سالم (باند های ۱۴۲۸bp و ۱۳۰)، ۶-۹: محصول PCR بدون برش آنزیمی (باند ۱۵۶۸bp)، ۱۰: مارکر وزن مولکولی ۱۰.۱Kb، مارکر وزن مولکولی VIII.

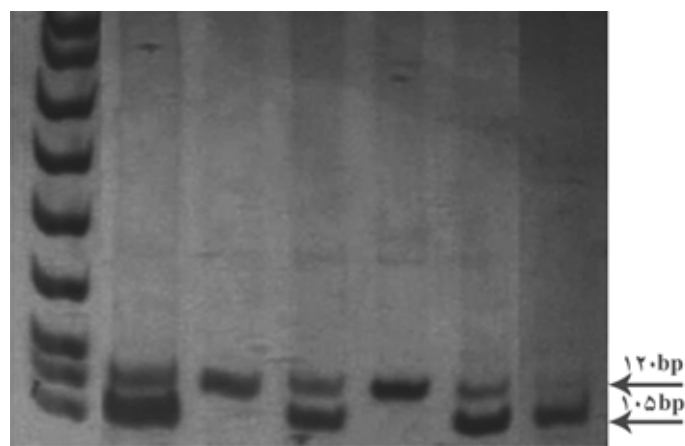


شکل ۱- نتایج الکتروفورز محصولات PCR پس از RFLP برای پلی مورفیسم FV Leiden بر روی ژل پلی آکرلامید: ۱: هموزیگوت (باند های ۷۱bp و ۶۹)، ۲: هتروزیگوت (باند های ۷۱bp، ۶۹، ۳۶ و ۳۵)، ۳-۴: سالم (باند های ۶۹، ۳۶ و ۳۵)، ۵: سالم (باند های ۷۱، ۶۹، ۳۶ و ۳۵)، ۶ و ۷: سالم (باند های ۶۹، ۳۶ و ۳۵)، ۸: مارکر وزن مولکولی VIII (۳۶ و ۳۵).

بحث

در این مطالعه فراوانی سه پلی مورفیسم ژن فاکتور ۵ انعقادی شامل FV G1691A (FV Leiden)، FV A5279G و FV A4070G در زنان ایرانی مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی، مورد مطالعه قرار گرفت. این سه پلی مورفیسم را عامل نقص در فاکتور ۵ انعقادی و ایجادکننده ترومبوفیلی می دانند؛ اما تنها در مورد FV Leiden نتایج مطالعات وسیعی در دسترس است. مطالعات بسیاری وجود دارند که این پلی مورفیسم را عامل افزایش خطر سقط مکرر معرفی

کرده اند در حالی که گزارشات دیگری وجود دارند که ارتباط بین این پلی مورفیسم و سقط مکرر را نفی کرده اند. این اختلاف می تواند به علت تفاوتها در معیار انتخاب بیماران و گروه شاهد باشد. Rai و همکاران و نیز Nowak-Gottl و همکاران، با مطالعه روی زنان مبتلا به سقط مکرر، هیچ افزایش فراوانی موتاسیون فاکتور ۵ انعقادی را نسبت به گروه کنترل مشاهده نکردند (۱۹،۲۲). به علاوه، Yamada و همکاران در یافتند که هیچ کدام از ۳۵ زن مبتلا به سقط مکرر مورد مطالعه ناقل موتاسیون FV Leiden نیستند. اخیراً Wrambsy و همکاران فراوانی ۱۵/۵٪ موتاسیون FV Leiden را در بین زنان با سه یا بیش از سه سقط قبل از هفته ۲۲ را گزارش کرده اند (۷). پس از ارزیابی مقایسه ای با خارج کردن دیگر عوامل سقط مکرر، فراوانی آن به ۲۷/۸٪ رسید. قابل ذکر است که Rai و همکاران، فراوانی FV Leiden را با انتخاب ۱۰۰۰ زن مبتلا به سقط مکرر، که تاکنون بزرگترین گروه بیمار مورد مطالعه است، ۳/۳٪ در بین زنان با سقط مکرر در سه ماهه اول و ۳/۹٪ در بین زنان با سقط مکرر در سه ماهه دوم در مقایسه با فراوانی ۴٪ در گروه کنترل را مشاهده کردند. از سوی دیگر، Rai و همکاران با



شکل ۳- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم FVA4079G بر روی ژل پلی آکرلامید: ۱: مارکر وزن مولکولی VIII، ۲، ۴ و ۶: هتروزیگوت (باند های ۱۲۰bp و ۱۰۵)، ۳، ۵ و ۷: هموزیگوت (باند ۱۲۰bp)، ۸: سالم (باند ۱۰۵).

عادی در معرض خطر ترومبوز بوده و این افزایش خطر، در افراد هموزیگوت به طور محسوسی بیش از افراد هتروزیگوت دیده می‌شود (۳۷،۳۸).

در مطالعه حاضر، فراوانی موتاسیون FV Leiden در بین گروه بیماران ۱۳٪ و در گروه کنترل ۴٪ بود (جدول ۲). فراوانی این موتاسیون در مطالعه زینعلی و همکاران در جمعیت ایرانی، ۵/۵٪ گزارش شده است (۳۹) که کمتر از فراوانی این موتاسیون در بین گروه بیماران مطالعه حاضر است. فراوانی ۷/۱٪ و ۱۷٪ برای بیماران مبتلا به سقط مکرر به ترتیب در زنان برزیلی و امریکایی گزارش شده است (۱۶). نتایج مطالعه حاضر که فراوانی ۱۳٪ برای این موتاسیون را نشان داده است، نسبت به مطالعه دیگری که در بین ۶۵ زن مبتلا به سقط مکرر در جمعیت ایرانی انجام شده و نتیجه ۲۰٪ (۱۳ نفر از ۶۵) را مشاهده کرده، کمتر است (۱۶). این تفاوت می‌تواند مربوط به اختلاف در تعداد افراد گروه بیمار مورد مطالعه و نیز تفاوت در معیارهای ورود به مطالعه باشد. با این حال، نتایج حاضر نیز ارتباط بین موتاسیون FV Leiden و سقط مکرر را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد در حضور این موتاسیون، خطر ابتلا به سقط مکرر تا ۳/۵۶ برابر بیشتر خواهد شد. تعداد بسیار اندک افراد هموزیگوت مشاهده شده برای این پلی مورفیسم در این مطالعه (در گروه بیمار، تنها ۱ نفر بوده و موردی نیز در گروه کنترل دیده نشد) و نیز مطالعات دیگر روی جمعیت ایرانی و بسیاری دیگر از مطالعات در سایر جمعیتها می‌تواند ناشی از عوارض شدید ترومبوتیک حاصل از هموزیگوسیتی برای این پلی مورفیسم در مادران و نیز جنین‌های آنان باشد. بدین معنا که به نظر می‌رسد هموزیگوسیتی برای FV Leiden می‌تواند مانع رگ‌زایی صحیح برای جفت شده و لذا باعث سقط زودرس جنین دو یا سه هفته پس از لقاح شود (۴۱، ۴۰، ۳۹، ۵). همچنین گزارشات وجود

ارزیابی نتایج آینده‌نگرانه بارداری‌های درمان نشده ۲۵ زن هتروزیگوت برای آلل FV Leiden و مبتلا به سقط مکرر، در مقایسه با زنانی با همان سابقه بارداری ولی فاقد موتاسیون FV Leiden، مشاهده کرد که نرخ تولد زنده در گروه اول کمتر از گروه دوم است (۳۷/۵٪ در مقابل ۶۹/۳٪). این نتایج نشان می‌دهد که توارث آلل FV Leiden می‌تواند منجر به سقط مکرر شود، به خصوص اگر با ترومبوز جفت همراه باشد (۱۹). همکاران نیز فراوانی بالاتر آلل FV Leiden را در بین زنان مبتلا به سقط مکرر گزارش کرد (۱۱/۱٪) (۱۳). همین گروه در مطالعه‌ای از بین ۱۶ بیمار مبتلا به سقط مکرر، در ۱۹٪ آنها پلی مورفیسم FV Leiden را مشاهده کردند، در حالی که تنها در ۶٪ از گروه کنترل این پلی مورفیسم دیده شد (۱۲). در گزارش دیگری، از ۴۴ زن با سابقه بیش از سه سقط مکرر خودبخودی، ۹ نفر (۲۱/۵٪) دارای پلی مورفیسم FV Leiden بودند، در مقابل تنها ۷/۴٪ از افراد گروه کنترل واجد این پلی مورفیسم بودند (۳). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۴۹ زن مبتلا به سقط مکرر، مشاهده شد که خطر حداقل دو سقط یا مشکلات باروری دیگر، تا ۲/۲ برابر افزایش می‌یابد (۱۰). در مقابل، در مطالعه‌ای بر روی ۷۱۴ بیمار دارای حداقل دو سقط مکرر، افزایش فراوانی پلی مورفیسم FV Leiden در سقط مکرر مشاهده نشد (۳۶). ژن فاکتور ۵ انعقادی به صورت هم‌غالبی بیان می‌شود. ۹۵-۹۰٪ افراد دارای موتاسیون FV Leiden، هتروزیگوت و باقی هموزیگوت بودند. در مطالعه‌ای در سوئد روی ۳۰۶ فرد دارای این موتاسیون، نشان داده شد که تا سن ۳۳ سالگی ۴۰٪ افراد هموزیگوت دچار عوارض ترومبوتیک شدند، در حالی که این مورد تنها در ۲۰٪ افراد هتروزیگوت دیده شده است. اطلاعات بدست آمده از مطالعات ترومبوفیلی لیدن نشان داده که بیماران FV Leiden، ۶/۶ برابر افراد

دارند که عدم موفقیت IVF را با هموزیگوسیتی برای این پلی مورفیسم مرتبط دانسته‌اند (۴۲).

فراوانی پلی مورفیسم FV A4070G در بین اقوام مختلف ۹/۵-۱۵/۲٪ گزارش شده است (۴۳). فراوانی این آلل در جمعیت ایتالیایی، ۸٪ ذکر شده است (۲۸). در مطالعه‌ای در لبنان در سال ۲۰۰۵، از ۱۲۵ نفر، ۱۳ نفر (۱۰/۴٪) دارای این آلل بودند که در بین آنها ۱۱ نفر (۸/۸٪) هتروزیگوت و ۲ نفر (۱/۶٪) هموزیگوت بودند. در این مطالعه، فراوانی بالای این موتاسیون در این جمعیت گزارش شد (۲۶). در مطالعه‌ای در بین جمعیت عرب در کشور کویت، درصد فراوانی این آلل در بین بیماران مبتلا، ۱۶/۵٪ بوده و خطر ابتلا به ترومبوز وریدی، ۲/۶۲ برابر نرخ جهانی گزارش شده است. در این مطالعه از ۱۸۸ بیمار، ۳۱ نفر (۱۶/۵٪) و از ۱۰۰ فرد گروه کنترل، ۷ نفر (۷٪) حامل این آلل بودند (۲۶).

Goodman و همکاران و Zammiti و همکاران، در دو مطالعه جداگانه، ارتباط این پلی مورفیسم را با سقط مکرر بررسی کردند ($p < 0/0001$ و $p = 0/83$) (۵،۱۱). Zammiti و همکاران، گرچه ارتباط وجود این پلی مورفیسم را با سقط مکرر رد کرده‌اند؛ ولی ارتباط هموزیگوسیتی آن را با افزایش خطر سقط مکرر پس از ۸ هفته از بارداری را تأیید می‌کنند ($p = 0/0002$). در مطالعه حاضر، فراوانی ۱۴٪ برای پلی مورفیسم FV A4070G در بین بیماران و ۴٪ برای گروه شاهد مشاهده شد، که به نتایج مطالعات بالا نزدیک است. براساس نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر، این پلی مورفیسم با سقط مکرر ارتباط داشته ($p = 0/047$) و خطر ابتلا به سقط مکرر در حضور این موتاسیون، ۳/۲۷۳ برابر خواهد شد؛ که با نتایج مطالعه Goodman و همکاران همخوانی دارد.

از آن جا که پلی مورفیسم FV A5279G، اخیراً گزارش شده است، لذا مطالعات محدودی در مورد ارتباط و نحوه عملکرد و اثر آن بر نقص فاکتور ۵ انعقادی و

ترومبوز انجام گرفته است. تحقیقات انگشت‌شماری نیز در مورد ارتباط آن با سقط مکرر وجود دارد؛ بنابراین امکان کمتری برای مقایسه نتایج وجود دارد. به هر حال، در مطالعه‌ای در جمعیت ایتالیایی، ارتباط FV A5279G با افزایش خطر ترومبوز و نقص فاکتور ۵ انعقادی تأیید شده است (۳۴). در این مطالعه، ناقل بودن برای FV A5279G در ۸ بیمار مبتلا به نقص فاکتور ۵، در ۱۶ فرد مبتلا به نقص جزئی فاکتور ۵ انعقادی بدون علامت و در ۹ بیمار مبتلا به APCR شبه هموزیگوت بررسی شد. نتیجه بدست آمده نشان داد که FV A5279G یکی از عوامل مهم نقص فاکتور ۵ انعقادی و ترومبوز است (۳۴). در دو مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده، ارتباط بین این موتاسیون و سقط مکرر را تأیید نکرده‌اند (۵،۱۱)؛ در حالی که در مطالعه حاضر، فراوانی این موتاسیون ۳۷٪ و افزایش خطر ۷/۸۰۳ برابری بدست آمد که در مقایسه با دو موتاسیون دیگر، بسیار بیشتر بود. این تفاوت می‌تواند ناشی از تفاوت ژنتیکی جمعیت ایرانی با دو جمعیت مورد مطالعه در این دو تحقیق باشد.

با توجه به مطالعات مختلف که روی جمعیت‌های متفاوتی انجام گرفته است و نتایج متفاوتی را در تأیید یا رد ارتباط این سه پلی مورفیسم فاکتور ۵ انعقادی با سقط مکرر را گزارش کرده‌اند، ترکیب ژنی زنان ایرانی (ژنوتیپ) هم ممکن است با زنان برخی ملل متفاوت باشد، ولی این مطالعه نشان می‌دهد که ارتباط موتاسیون ژن‌های فاکتور ۵ انعقادی با سقط مکرر در زنان ایرانی نیز مثل برخی از ملل دیگر است (۵،۱۱).

در این دو مطالعه، به طور همزمان این سه پلی مورفیسم مورد بررسی قرار گرفته‌اند. Goodman و همکاران، ارتباط دو پلی مورفیسم FV Leiden و FV A4070G را با سقط مکرر تأیید کرده‌اند (۱۱)؛ در حالی که Coulam و همکاران، ارتباط هر سه پلی مورفیسم را با سقط مکرر رد می‌کنند (۲۳)؛ ولی در عین حال، وجود هر سه

گفت که موتاسیون‌های فاکتور ۵ انعقادی می‌توانند نقشی مؤثر در افزایش خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان ایرانی داشته باشند. بنابراین می‌توان با تأیید حضور این موتاسیون‌ها در زنان ایرانی، احتمال خطر برای سقط مکرر را مشخص کرد. لذا، بررسی این موتاسیون‌ها در زنان ایرانی مبتلا به سندرم سقط مکرر، می‌تواند راهگشا باشد.

تشکر و قدردانی

این طرح با حمایت مالی پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا براساس مصوبه شماره ۴۳۹۰۱۳ مورخ ۱۳۸۴/۱۰/۱۷ انجام گرفته است. نویسندگان این طرح، از تمامی همکاران پژوهشکده آنتی‌بادی مونوکلونال و مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن‌سینا که در اجرای این پروژه و پیشبرد اهداف طرح نقش مؤثر داشته‌اند، کمال تشکر را دارد.

References

- 1- Tulppala M, Ylikorkala O. Recurrent spontaneous abortion: where do we stand now? *Ann Med.* 1991; 23(6): 603-4.
- 2- Tulppala M, Palosuo T, Ramsay T, Miettinen A, Salonen R, Ylikorkala O. A prospective study of 63 couples with a history of recurrent spontaneous abortion: contributing factors and outcome of subsequent pregnancies. *Hum Reprod.* 1993; 8(5): 764-70.
- 3- Glueck CJ, Gogenini S, Munjal J, Tracy T, Pranikoff J, Wang P. Factor V Leiden mutation: a treatable etiology for sporadic and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2008; 89(2): 410-6.
- 4- Baek KH, Lee EJ, Kim YS. Recurrent pregnancy loss: the key potential mechanisms. *Trends Mol Med.* 2007; 13(7): 310-7.
- 5- Zammiti W, Mtiraoui N, Mercier E, Abboud N, Saidi S, Mahjoub T, et al. Association of factor V gene polymorphisms (Leiden; Cambridge; Hong Kong and HR2 haplotype) with recurrent idiopathic pregnancy loss in Tunisia. A case-control study. *Thromb Haemost.* 2006; 95(4): 612-7.
- 6- Younis JS, Brenner B, Ohel G, Tal J, Lanir N, Ben-Ami M. Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first-as well as second-trimester recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2000; 43(1): 31-5.
- 7- Wramsby ML, Sten-Linder M, Bremme K. Primary habitual abortions are associated with high frequency of factor V Leiden mutation. *Fertil Steril.* 2000; 74(5): 987-91.
- 8- Wolf CE, Haubelt H, Pauer HU, Hinney B, Krome-Cesar C, Legler TJ, et al. Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, FII G20210A and polymorphisms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2003; 33(3): 134-7.
- 9- Pauer HU, Voigt-Tschirschwitz T, Hinney B, Burfeind P, Wolf C, Emons G, et al. Analyzes of three common thrombophilic gene mutations in German women with recurrent abortions. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003; 82(10): 942-7.
- 10- Hopmeier P, Puehringer H, van Trotsenburg M,

پلی مورفیسم به طور همزمان در یک فرد را بر افزایش خطر سقط مکرر مؤثر نشان داده‌اند (۲۳).

در مطالعه حاضر مشخص شد که احتمالاً به علت وجود همراهی بین دو پلی مورفیسم FV Leiden و FV A4070G که در بخش نتایج به آن اشاره شد، این دو پلی مورفیسم با هم یک اثر همزمان را بر شانس وقوع سقط مکرر ایجاد می‌کنند. بدین معنا که در صورت وجود همزمان این دو پلی مورفیسم در یک فرد، تنها با بررسی پلی مورفیسم FV A4070G می‌توان به اثر هر دو پلی مورفیسم پی برد. بنابراین وجود هر سه موتاسیون با افزایش خطر وقوع سقط مکرر ارتباط دارد و لذا با بررسی دو موتاسیون FV A4070G و FV A5279G هنوز می‌توان اثر همزمان هر سه موتاسیون فاکتور ۵ انعقادی را بر شانس وقوع سقط مکرر ارزیابی کرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، می‌توان

- Atamaniuk J, Oberkanins C, Dossenbach-Glaninger A. Association of endothelial protein C receptor haplotypes, factor V Leiden and recurrent first trimester pregnancy loss. *Clin Biochem*. 2008; 41(12): 1022-4.
- 11- Goodman CS, Coulam CB, Jeyendran RS, Acosta VA, Roussev R. Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *Am J Reprod Immunol*. 2006; 56(4): 230-6.
 - 12- Glueck CJ, Wang P, Bornovali S, Goldenberg N, Sieve L. Polycystic ovary syndrome, the G1691A factor V Leiden mutation, and plasminogen activator inhibitor activity: associations with recurrent pregnancy loss. *Metabolism*. 2003; 52(12): 1627-32.
 - 13- Glueck CJ, Pranikoff J, Aregawi D, Haque M, Zhu B, Tracy T, et al. The factor V Leiden mutation, high factor VIII, and high plasminogen activator inhibitor activity: etiologies for sporadic miscarriage. *Metabolism*. 2005; 54(10): 1345-9.
 - 14- Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, et al. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod*. 2000; 15(2): 458-62.
 - 15- Foka ZJ, Lambropoulos AF, Makris PE, Constantinidis TC, Kotsis A. High frequency of factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations in Greek hemophiliacs. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(5): 1116-7.
 - 16- Behjati R, Modarressi MH, Jeddi-Tehrani M, Dokoohaki P, Ghasemi J, Zarnani AH, et al. Thrombophilic mutations in Iranian patients with infertility and recurrent spontaneous abortion. *Ann Hematol*. 2006; 85(4): 268-71.
 - 17- Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H. Genetic factors in fetal growth restriction and miscarriage. *Semin Thromb Hemost*. 2005; 31(3): 334-45. Review.
 - 18- Razieli A, Kornberg Y, Friedler S, Schachter M, Sela BA, Ron-El R. Hypercoagulable thrombophilic defects and hyperhomocysteinemia in patients with recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 45(2): 65-71.
 - 19- Rai R, Shlebak A, Cohen H, Backos M, Holmes Z, Marriott K, et al. Factor V Leiden and acquired activated protein C resistance among 1000 women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2001; 16(5): 961-5.
 - 20- Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rübsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, et al. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin mutation increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 46(2): 124-31.
 - 21- Ozcan T, Rinder HM, Murphy J. Genetic thrombophilia mutations are not increased in patients with recurrent losses. *Obstet Gynecol*. 2001; 97(4 Suppl 1): S31.
 - 22- Nowak-Göttl U, Sonntag B, Junker R, Cirkel U, von Eckardstein A. Evaluation of lipoprotein(a) and genetic prothrombotic risk factors in patients with recurrent foetal loss. *Thromb Haemost*. 2000; 83(2): 350-1.
 - 23- Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations rather than specific gene mutations are risk factors for recurrent miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2006; 55(5): 360-8.
 - 24- Carp H, Salomon O, Seidman D, Dardik R, Rosenberg N, Inbal A. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2002; 17(6): 1633-7.
 - 25- Alonso A, Soto I, Urgellés MF, Corte JR, Rodríguez MJ, Pinto CR. Acquired and inherited thrombophilia in women with unexplained fetal losses. *Am J Obstet Gynecol*. 2002; 187(5): 1337-42.
 - 26- Strey RF, Siegemund A, Siegemund T, Schubert C, Schuster G, Wulff K, et al. Influence of factor V HR2 on thrombin generation and clinical manifestation in rare bleeding disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005; 34(6): 279-83.
 - 27- Soria JM, Blangero J, Souto JC, Martínez-Sánchez E, Martínez-Marchán E, Coll I, et al. Identification of a large deletion and three novel mutations in exon 13 of the factor V gene in a Spanish family with normal factor V coagulant and anticoagulant properties. *Hum Genet*. 2002; 111(1): 59-65.
 - 28- Otrrock ZK, Taher AT, Shamseddeen WA, Zaatari G, Bazarbachi A, Mahfouz RA. Factor V HR2 haplotype: a risk factor for venous thromboembolism in individuals with absence of Factor V Leiden. *Ann Hematol*. 2008; 87(12): 1013-6.
 - 29- Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B, Tormene D, Girelli D, et al. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood*. 2000; 96(4): 1443-8.
 - 30- Castoldi E, Lunghi B, Mingozzi F, Simioni P, Girolami A, Bernardi F. A highly polymorphic microsatellite in the factor V gene is an informative tool for the study of factor V-related disorders. *Br J Haematol*. 2001; 114(4): 868-70.
 - 31- Castoldi E, Brugge JM, Nicolaes GA, Girelli D, Tans G, Rosing J. Impaired APC cofactor activity of factor V plays a major role in the APC resistance associated with the factor V Leiden (R506Q) and R2 (H1299R) mutations. *Blood*. 2004; 103(11): 4173-9.
 - 32- Zammiti W, Mtiraoui N, Mercier E, Abboud N, Saidi S, Mahjoub T, et al. Association of factor V gene polymorphisms (Leiden; Cambridge; Hong Kong and

- HR2 haplotype) with recurrent idiopathic pregnancy loss in Tunisia. A case-control study. *Thromb Haemost.* 2006; 95(4): 612-7.
- 33- van Wijk R, Nieuwenhuis K, van den Berg M, Huizinga EG, van der Meijden BB, Kraaijenhagen RJ, et al. Five novel mutations in the gene for human blood coagulation factor V associated with type I factor V deficiency. *Blood.* 2001; 98(2): 358-67.
- 34- Castoldi E, Lunghi B, Mingozzi F, Muleo G, Redaelli R, Mariani G, et al. A missense mutation (Y1702C) in the coagulation factor V gene is a frequent cause of factor V deficiency in the Italian population. *Haematologica.* 2001; 86(6): 629-33.
- 35- Yamakage N, Ikejiri M, Okumura K, Takagi A, Murate T, Matushita T, et al. A case of coagulation factor V deficiency caused by compound heterozygous mutations in the factor V gene. *Haemophilia.* 2006; 12(2): 172-8.
- 36- Jivraj S, Rai R, Underwood J, Regan L. Genetic thrombophilic mutations among couples with recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2006; 21(5): 1161-5.
- 37- Zöller B, Svensson PJ, He X, Dahlbäck B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest.* 1994; 94(6): 2521-4.
- 38- Koster T, Rosendaal FR, de Ronde H, Briët E, Vandenbroucke JP, Bertina RM. Venous thrombosis due to poor anticoagulant response to activated protein C: Leiden Thrombophilia Study. *Lancet.* 1993; 342 (8886-8887): 1503-6.
- 39- Zeinali S, Duca F, Zarbakhsh B, Tagliabue L, Mannucci PM. Thrombophilic mutations in Iran. *Thromb Haemost.* 2000; 83(2): 351-2.
- 40- Zahed LF, Rayes RF, Mahfouz RA, Taher AT, Maarouf HH, Nassar AH. Prevalence of factor V Leiden, prothrombin and methylene tetrahydrofolate reductase mutations in women with adverse pregnancy outcomes in Lebanon. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195(4): 1114-8.
- 41- Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ, D'Mello M, Regan C, Whitehead AS, et al. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(1): 266-70.
- 42- Azem F, Many A, Ben Ami I, Yovel I, Amit A, Lessing JB, et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Hum Reprod.* 2004; 19(2): 368-70.
- 43- Castaman G, Faioni EM, Tosetto A, Bernardi F. The factor V HR2 haplotype and the risk of venous thrombosis: a meta-analysis. *Haematologica.* 2003; 88(10): 1182-9.
- 44- Yamada H, Kato EH, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, et al. Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia. *Semin Thromb Hemost.* 2001; 27(2): 121-9. Review.