

## ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژنی *VEGF (2578C/A)* و رسپتور آن *KDR (Q472H)* در زنان مبتلا به سقط مکرر خودبخودی

فرشته بهرامی هیدجی<sup>۱</sup>، دکتر گلناز اسعدی تهرانی<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد زیست‌شناسی ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، گروه ژنتیک، زنجان، ایران

۲. PhD ژنتیک مولکولی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، گروه ژنتیک، زنجان، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) و گیرنده واجد دومین کینازی آن (KDR) به منظور فرایند رگ‌زایی و تکامل جنینی واجد اهمیت حیاتی می‌باشند. با این وجود، اطلاعات محدودی پیرامون نقش سیستم VEGF، به خصوص گیرنده KDR در سقط مکرر خودبخودی (RPL) در دسترس است. از این رو هدف از مطالعه حاضر، بررسی تعیین ارتباط بین پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های *VEGF* و *KDR* با سقط مکرر خودبخودی با علت ناشناخته می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در یک مطالعه‌ی مورد-شاهدی، ۵۰ خانم با سابقه‌ی حداقل دو سقط مکرر با علت نامشخص به عنوان گروه بیمار و ۵۰ خانم بدون سابقه‌ی سقط مکرر و دارای حداقل دو بارداری موفق به عنوان شاهد در استان تهران انتخاب شدند. پلی‌مورفیسم *2578C/A* برای ژن *VEGF* و پلی‌مورفیسم *Q724H* برای ژن *KDR* به ترتیب از طریق روش‌های Tetra-primer-ARMS-PCR و PCR-RFLP تعیین ژنوتیپ شدند. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) و مربع کای، مورد آنالیز قرار گرفتند. **یافته‌ها:** فراوانی ژنوتیپ‌های AC، CC و AA در پلی‌مورفیسم *VEGF* در گروه‌های شاهد و مورد به ترتیب ۵۶، ۲۰ و ۲۴ درصد و ۲۶، ۴۶ و ۲۸ درصد محاسبه گردید ( $P < 0/003$ ) و در پلی‌مورفیسم *KDR* مقادیر ژنوتیپ‌های AA، AT و TT گروه شاهد ۴۲، ۱۶ و ۴۲ درصد و در گروه مورد به ترتیب ۳۰، ۶۸ و ۲ درصد بود ( $P < 0/009$ ). **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که پلی‌مورفیسم‌های *2578C/A* و *Q472H* در ژن *VEGF* و گیرنده‌ی آن *KDR* با سقط مکرر خودبخودی در خانم‌های ایرانی در ارتباط هستند.

### واژگان کلیدی: سقط مکرر خودبخودی (RPL)، ژن *VEGF*، رسپتور *KDR*

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Bahrami Hidaji F, Asaadi Tehrani G. Association between the *VEGF (2578C/A)* and *KDR (Q724H)* gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion *VEGF* and *KDR* gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Pejouhandeh* 2016;21(1):6-12.

### مقدمه

سقط مکرر خودبخودی (Recurrent spontaneous abortion-RSA) به از دست رفتن تکراری محصول لقاح، پیش از هفته ۲۰ بارداری اطلاق می‌گردد. در حدود ۲۰-۱۵٪ از بارداری‌های تشخیص داده شده از نظر بالینی، به‌صورت خودبخودی در سه ماهه‌ی اول سقط می‌گردند. علت اصلی سقط مکرر، نقایص کروموزومی جنین است، به‌طوری‌که در ۵۰ تا ۶۰ درصد از موارد با آنیوپلوئیدی‌های کروموزومی جنین

همراه می‌باشد. از دیگر موارد می‌توان به اختلالات رحمی، عفونت‌ها، علل هورموناال یا اندوکراین، اختلال در فاکتورهای ایمنولوژیک، ترومبوفیلی ارثی و اکتسابی یا عوامل محیطی و تغذیه‌ای اشاره نمود. با این وجود، در بیش از ۵۰٪ از موارد علل سقط از نظر اتیولوژیک ناشناخته است. سطح سرمی b-hCG و فاکتورهای سونوگرافی مثل ضربان قلب جنینی جهت پیش‌آگهی و تشخیص سقط خودبخودی، مورد بررسی قرار می‌گیرند (۲،۱).

برخی مطالعات به خصوص حاکی از ارتباط ژن‌ها با سقط مکرر خودبخودی هستند. یکی از مهمترین این ژن‌ها، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF) می‌باشد که یک گلیکوپروتئین اتصال‌ی به

\*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر گلناز اسعدی تهرانی؛ زنجان، اعتمادیه، خیابان معلم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه و پزشکی، گروه ژنتیک؛ کد پستی: ۴۵۱۵۶۱۴۵؛ شماره فکس: ۳۳۴۲۱۱۹۲ (۰۲۴)، تلفن: ۰۹۱۲۵۷۰۶۷۱۹؛ پست الکترونیک: Golnaz\_asaadi@yahoo.com

می‌شود، تصور می‌شود که کنش بین VEGF و KDR به علت فعالیت تیروزین کینازی آن و وساطت در اثرکردهای رگ‌زایی پایین‌دست، از اهمیت بیشتری برخوردار باشد. مطالعات ژنتیکی روی سیستم VEGF/KDR در زمینه‌هایی چون سرطان سینه، بیماری‌های عروق کرونر، فوق حساسیت مسیره‌های هوایی/آتروفی، پسوریازیس، بیماری کوااسکی و تخریب عضلانی انجام گرفته است، اما در زمینه‌ی سقط مکرر خودبخودی با علت ناشناخته، هنوز نتیجه‌ی مطالعات، متناقض می‌باشد (۱۴).

با توجه به اهمیت رگ‌زایی در اوایل دوران بارداری و تشکیل جفت، فرضیه‌ی تحقیق حاضر بر این اساس بود که خانم‌های حامل آلل پرخطر ژن‌های VEGF و یا KDR با احتمال بیشتری مستعد ابتلا به سقط جنین خواهند بود. تغییر در عملکرد KDR باعث نقص در بازدهی اتصال VEGF به آن، تغییر در مسیره‌های سیگنالی پایین‌دست و تداخل با بارداری می‌شود. تاکنون چندین SNP متداول و مؤثر در کارکرد ژن‌های VEGF و KDR شناسایی شده است که با توجه به عملکردشان در کارکرد و بیان این ژن‌ها، به نظر می‌رسد که در پاتوژنز RSA دخیل می‌باشند و در صورت تأیید نقششان می‌توانند به‌عنوان یک مارکر تشخیصی مهم جهت پیش‌گیری از سقط جنین مورد استفاده قرار گیرند. از این جهت در مطالعه‌ی حاضر، ارتباط بین پلی‌مورفیسم 2578C/A در ژن VEGF و پلی‌مورفیسم Q472H در رسیپتور KDR با سقط مکرر خودبخودی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد-شاهدی، ۵۰ خانم با سابقه‌ی سقط مکرر خودبخودی با علت نامشخص، به عنوان گروه بیمار و ۵۰ خانم بدون سابقه‌ی سقط و دارای حداقل دو باروری موفق، به عنوان گروه شاهد، از میان مراجعه‌کنندگان به بیمارستان تخصصی صرم تهران انتخاب شدند. عوامل مؤثر در سقط مکرر خودبخودی مانند کاریوتیپ، عوامل آناتومی، عوامل هورمونی، عوامل عفونی و عوامل ایمنولوژیک در بیماران مورد ارزیابی قرار گرفتند و در تمامی موارد نرمال بودند. میانگین سنی در گروه بیمار ۲۷/۵۸ سال و تعداد سقط‌های مکرر بین ۲ تا ۱۰ مورد بود. همچنین، میانگین سنی در گروه شاهد ۲۵/۴۸ سال و تعداد بارداری‌های موفق این گروه ۲ تا ۴ مورد بود. جهت ورود به مطالعه و انجام خون‌گیری، از تمامی افراد مورد مطالعه رضایت‌نامه‌ی آگاهانه اخذ گردید و سپس ۵

هیپارین بوده و نقش مهمی در تکامل جنین و توسعه‌ی رگ‌سازی جفت ایفا می‌کند (۳). رگ‌زایی (Angiogenesis) به رشد و تکامل عروق خونی از طریق جوانه زدن از سلول‌های اندوتلیال عروق اطلاق می‌شود (۴) که در افراد سالم و بالغ، پدیده‌ای نادر بوده و فقط به صورت موضعی و موقت، تحت شرایط فیزیولوژیک مشخص همانند ترمیم زخم‌ها، التهاب و چرخه‌ی جنسی زنان صورت می‌گیرد (۵). سلول‌های اصلی دخیل در این فرآیند، سلول‌های اندوتلیالی هستند که عروق خونی را پوشانده و تقریباً تمامی ساختار مویرگ‌ها را تشکیل می‌دهند. به منظور تشکیل عروق خونی جدید، ابتدا سلول‌های اندوتلیال از طریق شکافتن غشای پایه از محل همیشگی خود جدا شده و سپس به سمت ترکیبات محرک آنژیوژنز که از سلول‌های توموری، لنفوسیت‌های فعال شده و یا ماکروفاژهای موجود در محل جراحی ترشح می‌شوند، حرکت می‌نمایند. در غشای پایه سلول‌های اندوتلیال تکثیر می‌شوند تا سلول‌های مورد نیاز جهت تشکیل عروق خونی جدید را فراهم سازند (۶). فاکتور رشد اندوتلیال رگی در زنان، نقش ویژه‌ای در بیولوژی تخمدان ایفا می‌نماید و در بیماری‌های تخمدان مثل سرطان بدخیم تخمدان مؤثر است (۷). همچنین در مراحل جنینی در توسعه‌ی رگ‌سازی جفت و رشد رگ‌های خونی مادر و جنین در رحم مؤثر است (۸،۹). به‌علاوه، نقش‌های مهمی در بلوغ تخمک، تکثیر تروفوبلاست‌ها و لانه‌گزینی جنین در اوایل بارداری ایفا می‌کند (۱۰). رگ‌زایی پرزهای کوریونی با توسعه‌ی جنینی در ارتباط است و کاهش سطح VEGF تروفوبلاستی جفت در اندومتريوم دزیدوال در سقط خودبخودی مشاهده شده است. VEGF الفاکننده‌ی تکثیر و مهاجم سلول‌های اندوتلیال، افزایش‌دهنده‌ی نفوذپذیری عروق، کاهش دهنده‌ی آپوپتوز در سلول‌های اندوتلیال و تحریک‌کننده‌ی پروتئولیز استرومال می‌باشد (۱۱،۱۲).

خانواده‌ی VEGF شامل فاکتورهای رشد جفت-VEGF-A، VEGF-B، VEGF-C، VEGF-D و VEGF-E بوده، که در این بین VEGF-A مهمترین فاکتور رگ‌زایی به‌شمار می‌رود. VEGF-A روی کروموزوم 6q21.3 واقع شده و شامل ۸ اگزون و ۷ اینترون می‌باشد (۱۲،۱۳). VEGF و رسیپتورهای آن شامل VEGFR1/Flt-1 و VEGFR2/KDR/Flk-1 نقش اساسی در توسعه‌ی رگ‌زایی جنین و جفت ایفا می‌کنند. مشخص شده است که در موش‌های فاقد بیان ژن VEGF یا یکی از دو گیرنده، در نتیجه‌ی رگ‌زایی ناکافی داخل رحمی، می‌میرند. با وجود این که نقش بیولوژیکی VEGF از طریق این دو گیرنده ایفا

PCR با انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲٪ بررسی و با انجام تعیین توالی مستقیم، تأیید شد.

مواد لازم برای واکنش PCR-RFLP در حجم ۳۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم)، ۱۵ میکرولیتر Master Mix 1X، از هر جفت پرایمر ۱ میکرولیتر (۵ ماکرومولار) و آب دیونیزه (D.DW) ۱۱ میکرولیتر بود.

مراحل انجام روش PCR به ترتیب زیر، روی نمونه‌های DNA از دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA برای پلی‌مورفیسیم (rs1870377(Q472H)) در ۳۰ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. صحت انجام PCR با انجام الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۲٪ بررسی و با انجام تعیین توالی مستقیم، مورد تأیید قرار گرفت. محصولات PCR توسط آنزیم محدودالایر *ALU1* (Fermentase) مورد هضم قرار گرفت. سپس قطعات حاصل روی ژل آگاروز ۳٪، الکتروفورز شد و طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی، مشاهده گردید.

**آنالیز آماری.** کلیه داده‌ها در نرم افزار آماری SPSS وارد و برای مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها و فراوانی آللی بین دو گروه، از آزمون  $\chi^2$  و با تجزیه و تحلیل توالی مورد بررسی قرار گرفت.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌دار در آنالیزهای آماری در نظر گرفته شد.

میلی‌لیتر خون محیطی از افراد مورد و شاهد در لوله‌های حاوی EDTA گرفته شد.

**بررسی ژنوتیپ‌ها.** DNA ژنومی از لوکوسیت‌های خون محیطی استخراج گردید (کیت استخراج DNA شرکت سیناژن) و سپس جهت تعیین ژنوتیپ در ارتباط با پلی‌مورفیسیم‌های 2578C/A (rs 699947) و Q472H (rs1870377) به ترتیب از روش‌های Tetra-Primer ARMS-PCR و PCR-RFLP استفاده شد. پرایمرهای مناسب برای هر پلی‌مورفیسیم توسط نرم‌افزارهای Oligo5 و GeneRunner طراحی و سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای هر جفت آغازگر، بهینه‌سازی شد (جدول ۱). مواد لازم برای واکنش Tetra-Primer ARMS-PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم)، ۱۰ میکرولیتر Master Mix 1X Master Mix به طور ازپیش‌تهیه شده، حاوی آنزیم Taq DNA Polymerase، PCR buffer، Loading dye، dNTP و  $MgCl_2$  می‌باشد، از هر جفت پرایمر ۰/۵ میکرولیتر (۵ ماکرومولار) و ۶ میکرولیتر آب دیونیزه (D.DW) بود.

مراحل انجام روش PCR به ترتیب زیر، روی نمونه‌های DNA از دو گروه بیمار و شاهد انجام شد. پس از دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، قطعات DNA برای پلی‌مورفیسیم 2578C/A در ۳۰ سیکل (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) تکثیر یافتند و به دنبال آن، مرحله‌ی طویل‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. صحت انجام

جدول ۱. توالی پرایمرها و محصولات PCR پلی‌مورفیسیم 2578C/A ژن VEGF و Q472H ژن KDR.

| محصول PCR (bp)                             | روش مطالعه | توالی پرایمرها   | پلی مورفیسیم          |
|--|------------|--|-----------------------|
| AA:406/205<br>AC:406/256/205<br>CC:406/205 | ARMS-PCR   | FIP: 5'-GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGTAA-3'<br>RIP: 5'-CCAGTCAGTCTGATTATCCACCCAGACCG-3'<br>FOP :5'-GCCAGCCCTTTTCCTCATAAAGGGCCTTA-3<br>ROP : 5'-ACATCTTCCCTAAGTGCTCCCAAAGGCC-3' | VEGF<br>2578C/A       |
| AA:285/205<br>AT:283/493/212<br>TT:493     | PCR-RFLP   | F 5'-CCTCCTGTATCCTGAATGAATCT-3'<br>R 5'-TGGTACTGCTAAAAGTCAATGGT-3'   | KDR rs1870377 (Q472H) |

## یافته‌ها

روی ژل آگارز حاکی از اتصال پرایمرهای خارجی می‌باشد. دو پرایمر داخلی (Inner primer) نیز در این تکنیک استفاده گردید. پرایمر داخلی IPA هنگامی که جهش تک نوکلئوتیدی سیتوزین به آدنین صورت گرفته باشد به نوکلئوتید ۲۵۷۸ اگزون ۸ ژن VEGF متصل می‌گردد و باند bp ۲۵۶ را نشان

تحقیق حاضر روی ۱۰۰ نمونه شامل ۵۰ نفر در گروه مورد و ۵۰ نفر در گروه شاهد انجام گرفت. در بررسی پلی‌مورفیسیم 2578C/A در VEGF از روش Tetra-Primer ARMS-PCR استفاده گردید که وجود باند bp ۴۰۶ روی

می‌دهد. پرایمر داخلی IPC هنگامی که جهش مذکور در نوکلئوتید ۲۵۷۸ صورت نگرفته باشد به این ناحیه متصل می‌شود و باند ۲۰۵ bp را نشان می‌دهد (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج محصول PCR پلی‌مورفیسم 2578C/A در ژن VEGF در ژل آگاروز ۲٪. چاهک M مارکر ۵۰bp. چاهک ۱ و ۴: فرد هموزیگوت موتانت با ژنوتیپ CC. چاهک ۲ و ۳ و ۵: فرد هتروزیگوت با ژنوتیپ AC. چاهک ۶: فرد هموزیگوت نرمال با ژنوتیپ AA.

در بررسی فراوانی‌های ژنوتیپی و آلی این پلی‌مورفیسم، در

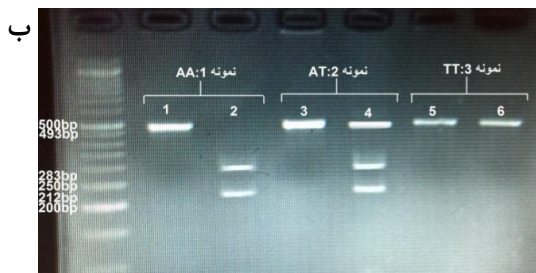
افراد بیمار درصد فراوانی‌های ژنوتیپی AA، AC و CC به ترتیب ۲۸٪، ۲۶٪ و ۴۶٪ و در جمعیت سالم مورد بررسی به ترتیب ۲۴٪، ۵۶٪ و ۲۰٪ به دست آمد. همچنین درصد فراوانی آلی 2578A و 2578C در جمعیت بیمار به ترتیب ۴۴٪ و ۵۶٪ و در جمعیت سالم به ترتیب ۵۲٪ و ۴۸٪ بود. طبق نتایج به دست آمده با وجود این که شیوع آلل تغییر یافته C در نمونه‌های بیمار، بیشتر از افراد شاهد بود، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ( $P=0/156$ ). همچنین فراوانی افراد هموزیگوت موتانت 2578CC در جمعیت بیمار، بیشتر از جمعیت نرمال مورد بررسی می‌باشد، این نشان‌دهنده‌ی آن است که افراد هموزیگوت نرمال به میزان کمتری دچار سقط مکرر خودبخودی می‌شوند. این نتایج با بررسی آماری نیز تأیید شد. آنالیز آماری نشان داد که  $\chi^2=0/003$  (کوچکتر از ۰/۰۵) بوده و در نتیجه بین دو جمعیت بیمار و نرمال، تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی ژنوتیپی و آلی در پلی‌مورفیسم‌های ژنی VEGF و گیرنده‌ی KDR برحسب گروه‌ها.

| P-value | بیمار (%)<br>N=۵۰ | شاهد (%)<br>N=۵۰ | فراوانی آلی در کل افراد مورد مطالعه     | پلی مورفیسم  |
|---------|-------------------|------------------|---|--------------|
| ۰/۱۵۶   | ۲۲(۴۴)            | ۲۶(۵۲)           | A                                       | VEGF 2578C/A |
|         | ۲۸(۵۶)            | ۲۴(۴۸)           | C                                       |              |
| ۰/۸۸۳   | ۳۱(۶۲)            | ۳۲(۶۴)           | A                                       | KDR Q472H    |
|         | ۱۹(۳۸)            | ۱۸(۳۶)           | T                                       |              |
| P-value | بیمار (%)         | شاهد (%)         | فراوانی ژنوتیپی در کل افراد مورد مطالعه |              |
| ۰/۰۰۳   | ۱۴(۲۸)            | ۱۲(۲۴)           | AA                                      | VEGF 2578C/A |
|         | ۱۳(۲۶)            | ۲۸(۵۶)           | AC                                      |              |
|         | ۲۳(۴۶)            | ۱۰(۲۰)           | CC                                      |              |
| ۰/۰۰۹   | ۱۵(۳۰)            | ۲۱(۴۲)           | AA                                      | KDR Q472H    |
|         | ۳۴(۶۸)            | ۲۱(۴۲)           | AT                                      |              |
|         | ۱(۲)              | ۸(۱۶)            | TT                                      |              |

۲۱۲bp و ۲۸۱ bp در افراد واجد آلل نرمال و یک باند ۴۹۳bp در افراد واجد آلل موتانت دیده شد (شکل ۲).

در بررسی پلی‌مورفیسم Q472H در ژن KDR محصول PCR تکثیر یافته با اندازه‌ی ۴۹۳ bp در طی الکتروفورز مشاهده گردید که از طریق هضم با آنزیم ALU1 دو باند



شکل ۲. بررسی نتایج مولکولی پلی‌مورفیسم در ژن KDR. الف) نتایج الکتروفورز محصول PCR پلی‌مورفیسم (Q472H) (rs1870377) در ژن گیرنده VEGF (KDR) در ژل آگاروز ۲٪ که محصول PCR با اندازه ۴۹۳ جفت باز را نشان می‌دهد. ب) انجام واکنش هضم آنزیمی روی محصول PCR: چاهک M مارکر ۵۰bp. چاهک ۱: محصول PCR بدون انجام هضم آنزیمی نمونه ۱. چاهک ۲: محصول PCR با انجام هضم آنزیمی نمونه ۱ با ژنوتیپ AA. چاهک ۳: محصول PCR بدون انجام هضم آنزیمی نمونه ۲. چاهک ۴: محصول PCR با انجام هضم آنزیمی نمونه ۲ با ژنوتیپ AT. چاهک ۵: محصول PCR بدون انجام هضم آنزیمی نمونه ۳. چاهک ۶: محصول PCR با انجام هضم آنزیمی نمونه ۳ با ژنوتیپ TT.



چندگانه‌ی سلول‌های اندوتلیال است. *VEGF*، الفاکننده‌ی تکثیر سلول‌های اندوتلیال، مهاجرت، تمایز و تحریک بقای سلول‌های اندوتلیال است که بسته به خصوصیات رگ‌زایی و میتوزنی خود، در توسعه‌ی جنینی حایز اهمیت می‌باشد. جفت جنین، غنی از فاکتورهای رگ‌زایی مثل *VEGF* است که نه تنها در تشکیل عروق جفتی، بلکه در تطابق عروق مادری در طی بارداری نیز مؤثر است، به طوری که تشکیل عروق خونی جدید جفت به صورت *de novo* مهمترین واقعه در سه ماه اول بارداری محسوب می‌شود. نقش *VEGF* در توسعه‌ی جنینی و رگ‌زایی تروفوبلاست‌ها تعیین شده و تغییر بیان *VEGF* و گیرنده‌های آن در جفت و نمونه‌های دزیدوال در موارد سقط اولیه، گزارش شده است (۱۵).

پلی مورفیسم‌های کارکردی در *VEGF* باعث تغییر نابهنگامی در تولید آن می‌گردد. ژن *VEGF* نه تنها روی سقط، بلکه در بسیاری از عوارض بارداری نیز مؤثر است. ژن *VEGF* بسیار پلی مورفیک می‌باشد. در مطالعات متعددی نشان داده شده است که تنوع ژنتیکی در فعالیت و بیان *VEGF* مؤثر است (۱۷، ۱۶). مهمترین پلی مورفیسم‌های تکنوکلونوتیدی شناسایی شده در این ژن شامل 1154G/A، 634G/C، +936C/T (rs3025039)، (rs1570360)، (rs2010963)، (rs3025020) 583T/C و -2578C/A (rs699947) می‌باشد. تاکنون ارتباط بین ۴ پلی مورفیسم اول به‌عنوان ریسک فاکتور سقط مکرر تأیید شده است، اما در طی تحقیقات انجام شده، نتایج متناقضی در ارتباط با نقش پلی مورفیسم 2578C/A و سقط مکرر گزارش گردیده است (۱۸).

در سال ۲۰۰۵، Papazoglou و همکاران به بررسی ارتباط بین چهار پلی مورفیسم شایع ژن فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (2578C/A، 1154G/A، -634G/C و 936C/T) با سقط مکرر خودبخودی در جمعیت یونان پرداختند که نتایج به‌دست آمده هیچ ارتباط معنی‌دار آماری بین پلی مورفیسم‌های 2578C/A (P=۰/۵۴)، 634G/C (P=۰/۲۱) و 936C/T (P=۰/۲۵) و سقط مکرر خودبخودی با توجه به فراوانی ژنوتیپی و آللی مشاهده نشد. تنها پلی مورفیسم 1154G/A از نظر آماری با سقط مکرر خودبخودی مرتبط بود (۱۹). در تحقیق مشابهی که در سال ۲۰۱۲ توسط Samli و همکاران در جمعیت ترکیه انجام گرفت، ارتباط بین پلی مورفیسم‌های 936C/T، 460C/T، 2578C/A و 1154G/A در ژن *VEGF* با سقط مکرر خودبخودی بررسی شد که تنها در مورد پلی مورفیسم

بررسی درصد فراوانی ژنوتیپی AA، AT و TT در افراد بیمار به ترتیب ۳۰٪، ۶۸٪ و ۲٪ و در جمعیت سالم مورد بررسی به ترتیب ۴۲٪، ۴۲٪ و ۱۶٪ به‌دست آمد. درصد فراوانی آللی 472A و 472T نیز در جمعیت بیمار به ترتیب ۶۲٪ و ۳۸٪ و در جمعیت سالم به ترتیب ۶۴٪ و ۳۶٪ بود. طبق نتایج به‌دست آمده، از نظر فراوانی آللی، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت شاهد و کنترل مشاهده نگردید (P=۰/۸۸۳) اما در بررسی ژنوتیپی نشان داده شد که فراوانی ژنوتیپ نرمال TT در افراد شاهد، ۸ برابر جمعیت بیمار بوده و همچنین در حدود ۹۸٪ از بیماران واجد آلل تغییر یافته A به‌صورت هوموزیگوت AA (۳۰٪) یا هتروزیگوت AT (۶۸٪) بودند. این نتایج با بررسی آماری نیز تأیید شد. با توجه به نتایج آزمون  $\chi^2$  مقدار P در فراوانی ژنوتیپی برابر ۰/۰۰۹ محاسبه گردید که نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنادار آماری بین جمعیت بیمار و نرمال می‌باشد (جدول ۲).

## بحث

تحقیق انجام گرفته نشان داد که پلی مورفیسم 2578C/A در ژن *VEGF* به‌صورت قابل ملاحظه‌ای با سقط مکرر با علت نامشخص در جمعیت خانم‌ها در استان تهران، در ارتباط است، به طوری که فراوانی ژنوتیپ تغییر یافته CC در ۴۶٪ یعنی نزدیک به نیمی از جمعیت بیمار مورد مطالعه، مشاهده گردید. این در حالی است که در جمعیت شاهد، فراوانی این ژنوتیپ تنها ۲۸٪ بود. همچنین در ارتباط با گیرنده‌ی آن *KDR* نیز ژنوتیپ نرمال TT به‌صورت قابل توجهی در جمعیت افراد بیمار در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافته بود، که این مسأله تأییدی بر اهمیت آن در رابطه با سقط مکرر خودبخودی می‌باشد.

حفظ بارداری نیازمند رگ‌زایی وسیع در ویلی‌های کوریونی و همچنین در طی مراحل تکامل بافت‌های جنینی است. در شرایط سقط مکرر، سطح بیان *VEGF* تروفوبلاستی جفت در اندتلیوم دزیدوال کاهش می‌یابد، که کاهش رگ‌زایی جفت با مرگ زود هنگام جنینی همراه است (۸). همچنین بلاستوسیت‌ها نیز mRNA رمزکننده‌ی *VEGF* را بیان می‌کنند که برای جنین لانه‌گزینی نموده، امکان القای سریع رگ‌زایی را از طریق اتصال *VEGF* به گیرنده‌ی اندومتريال خود فراهم می‌سازد. روی هم رفته، سیستم *VEGF/KDR* در مراحل اولیه‌ی بارداری از جمله لانه‌گزینی، تکامل جنینی و تشکیل جفت، مؤثر است (۱۲). *VEGF* دارای نقش‌های مهمی در نفوذپذیری عروق، رگ‌زایی و تنظیم عملکردهای

مسیرهای سیگنالی می‌گردد که در استقرار و حفظ بارداری مؤثرند (۲۲).

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق به بررسی ارتباط بین پلی‌مورفیسم  $2578C/A$  در ژن VEGF و پلی‌مورفیسم  $Q472H$  در ژن KDR با سقط مکرر خودبخودی در جمعیت زنان تهران پرداخته شد. نتایج به دست آمده نشان دادند تفاوت معنادار آماری بین دو گروه بیمار و نرمال از نظر هر دو پلی‌مورفیسم وجود دارد. همچنین، نظر به اینکه هرچه قرابت ژنتیکی در ریشه‌های اصلی دو جمعیت بیشتر باشد درصد نوع پلی‌مورفیسم‌های ژنی خاص در آن جمعیت‌ها شباهت بیشتری به یکدیگر دارند. به نظر می‌رسد که بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم‌های مورد مطالعه با سقط مکرر خودبخودی، در سایر قومیت‌های نژادی کشور نیز انجام گیرد تا از نحوه‌ی ارتباط بین این پلی‌مورفیسم و ابتلا به سقط‌های مکرر، اطلاعات بیشتری در دست باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی زنجان و جناب آقای دکتر میرزا احمدی به‌دلیل همکاری صمیمانه در انجام این پروژه، کمال امتنان را دارند.

1154G/A به‌صورت قابل ملاحظه‌ای بین جمعیت شاهد و بیمار اختلاف مشاهده گردید (۲۰).

مطالعه روی اهمیت پلی‌مورفیسم  $Q472H$  در گیرنده‌ی KDR و به‌صورت همزمان پلی‌مورفیسم‌های  $115G/A$  و  $V291I$  در ژن VEGF با سقط مکرر خودبخودی در تحقیقی توسط Su و همکاران در جمعیت تایوان انجام گرفت که نتایج این تحقیق نشان‌دهنده‌ی تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین بیماران و جمعیت کنترل و همچنین فرکانس هاپلوتایپ‌های VEGF (A-T-G) و KDR (A-C-T-G) بود ( $P < 0.05$ ) (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر برای نخستین بار نشان داده شد که در جمعیت مورد مطالعه، پلی‌مورفیسم  $Q472H$  در ژن KDR با سقط مکرر در ارتباط است. این SNP در اگزون ۱۱ گیرنده قرار گرفته و در گذشته به‌عنوان یک آلل پرخطر در بیماری عروق کرونر گزارش شده بود (۲۲). KDR واجد نقشی کلیدی در توسعه‌ی سلول‌های اندوتلیال بوده و بیان آن به این سلول‌ها و پیش‌سازهای جنینی آن محدود می‌شود (۲۳). همچنین KDR وظایف مهمی در توسعه‌ی شبکه‌ی عروق خونی ایفا می‌کند. با اتصال VEGF به KDR، چندین آبشار سیگنالی پایین دست از جمله مسیرهای AKT/PI3 kinase، پروتئین کیناز C، MAP کیناز و eNOS فعال می‌شوند که به مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیال و در نهایت تحریک رگ‌زایی منتهی می‌گردند (۲۴، ۲۵). پلی‌مورفیسم  $Q472H$  ژن KDR در دومین خارج سلولی N-ترمینال شبه‌ایمونوگلوبینی آن کارایی اتصال KDR به VEGF را کاهش داده و سبب تغییر فعالیت بیولوژیکی

### REFERENCES

1. Kutteh WH, Triplett DA. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med* 2006;24(1):54–66.
2. Yalcintepe SA, Silan F, Hacivelioglu SO, Uludag A, Cosar E, Ozdemir O. Fetal VEGF genotype is more important for abortion risk than mother genotype. *Int J Mol Cell Med* 2014;3(2):88–94.
3. Nonaka T, Ooki I, Enomoto T, Takakuwa K. Complex chromosomal rearrangements in couples affected by recurrent spontaneous abortion. *Int J Gynaecol Obstet* 2015;128(1):36–9.
4. Triggianese P, Perricone C, Perricone R, De Carolis C. Prolactin and natural killer cells: evaluating the neuroendocrine-immune axis in women with primary infertility and recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 2015;73(1):56–65.
5. Wong L, Poter T, de Jesus G. Recurrent early pregnancy loss and antiphospholipid antibodies: where do we stand? *Lupus* 2014;12:1226–8.
6. Ghafourian Boroujerdnia M, Amozegari Z. Increase of NK cells in decidua of women with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Infertil* 2002;3(1):22–31.
7. Fox S, Gasparini G, Harris A. Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol* 2001;2(5):278–89.
8. Zygumni M, Herr F, Munstedt K, Lang U, Liang OD. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;110 Suppl 1:S10–8.
9. Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EE, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP, et al. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ* 1996;7(2):147–60.

10. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates D, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res* 2008;15(68):4683–92.
11. Jackson M, Carney B, Lye S, Ritchie J. Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placenta throughout gestation. *Placenta* 1994;15:341–53.
12. Kruessel J, Behr B, Milki A, Hirchenhain J, Wen Y, Bielfeld P, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants are differentially expressed in human blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2001;7:57–63.
13. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(1):260–4.
14. Choi H, JH C, Kim J. Interleukin-18, transforming growth factor-beta, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and susceptibility to primary glomerulonephritis. *Tissue Antigens* 2010;76:289–96.
15. Demir R, Kaufmann P, Castellucci M, Erben T, Kotowski A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Acta Anat (Basel)* 1989;136(3):190–203.
16. Mohammadi M, Ollier W, Hutchinsdon I. functional association study of VEGF gene promoter polymorphisms with VEGF expression by stimulated PBM cells. *Hum Immunol* 2003;64(10): S125.
17. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis- and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17(6):803–12.
18. Xu X, Du C, Li H, Du J, Yan X. Association of VEGF genetic polymorphisms with recurrent spontaneous abortion risk: A systematic review and meta-analysis. *PloS one* 2015;10(4):e0123696.
19. Papazoglou D, Galazios G, Papatheodorou K, Liberis V, Papanas N, Maltezos E, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2005;83(4):959–63.
20. Samli H, Demir BC, Ozgoz A, Atalay MA, Uncu G. Vascular endothelial growth factor gene 1154 G/A, 2578 C/A, 460 C/T, 936 C/T polymorphisms and association with recurrent pregnancy losses. *Genet Mol Res* 2012;11(4) 4739–45.
21. Su M, Lin S, Lee I, Chen Y, Kuo P. Association of polymorphisms haplotypes of the genes encoding vascular endothelial growth factor and its KDR receptor with recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod* 2011;26(4):758–64.
22. Wang Y, Zheng Y, Zhang W, Yu H, Lou K, Zhang Y, *et al.* Polymorphisms of KDR gene are associated with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(8):760–7.
23. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K, Nakamura K, Morikawa S, Tanaka S. VEGF-A is involved in guidance of VEGF-receptor positive cells to the anterior portion of early embryos. *Mol Cell Biol* 2005;25:355–63.
24. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003;28(9):488–94.
25. Li X, Claesson-Welsh L, Shibuya M. VEGF receptor signal transduction. *Methods Enzymol* 2008;443:261–84.