Archive of SID

Original Article JQUMS, Vol.20, No.2, 2016, pp. 4-9

Association between polymorphism at 3′UTR of urokinase gene and risk of calcium kidney stones

S. Morovvati* N. Assari** SA. Angaji*** S. Daraii**

*Associate Professor of Medical Genetics, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**M.Sc. in Genetics, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
***Assistant Professor of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Kidney stone is a common multifactorial disease in Iran. Environmental and genetic factors including single nucleotide polymorphism (SNP) affect the incidence of kidney stones.

Objective: The aim of this study was to determine the association of +4065 T/C polymorphism at 3′untranslated region (3'UTR) of urokinase gene and calcium kidney stones.

Methods: This case-control study was conducted on 70 patients with history of calcium kidney stones as case group and 70 healthy subjects as control group in the Baqiyatallah hospital in 2013. The polymorphism was assessed using the Allele Specific PCR (AS-PCR) method. Allele and genotype frequencies of the two groups were compared using 2x2 contingency tables. Hardy-Weinberg equilibrium was compared between the two groups using Chi-square test.

Findings: Of 70 cases, 10 (15%) were heterozygous and 24 (34%) were homozygous for the polymorphism. Of 70 controls, 25 (35%) were heterozygous for the polymorphism. The frequency of mutant T allele was 41% in the case group and 18% in the control group. The frequency of mutant C allele was 59% in the case group and 82% in the control group. The risk of calcium kidney stones in carriers of the mutant allele was 1.7 times higher than non-carriers (OR: 1.7).

Conclusion: With regards to the results, it seems that there is a significant association between the polymorphism at 3′UTR of urokinase gene and formation of calcium kidney stones. Urokinase gene polymorphism may be introduced as a candidate gene involved in calcium stone formation.

Keywords: Single Nucleotide Polymorphism, 3' Untranslated Regions, Polymerase Chain Reaction
Citation: Morovvati S, Assari N, Angaji SA, Daraii S. Association between polymorphism at 3′UTR of urokinase gene and risk of calcium kidney stones. J Qazvin Univ Med Sci. 2016; 20 (2): 4-9.

Corresponding Address: Neda Assari, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Karaj, Iran
Email: Assari_69@yahoo.com
Tel: +98-913-4099335
Received: 13 Sep 2015
Accepted: 31 Dec 2015

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی ارتباط پلی‌مورفیسم ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز با احتمال ایجاد سنگ‌های کلسیمی کلیه

دکتر سعید مروتی* ندا عصاری** دکتر سید عبدالحمید انگجی*** سحر دارایی**

* دانشیار ژنتیک انسانی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران
** کارشناس ارشد زیست‌شناسی گرایش ژنتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
*** استادیار گروه علوم سلولی و مولکولی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤول: کرج، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه علوم سلولی و مولکولی، تلفن ۰۹۱۳۴۰۹۹۳۳۵
Email: Assari_69@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۶

چکیده

زمینه: سنگ کلیه یک بیماری چند عاملی شایع در ایران است. عوامل محیطی و ژنتیکی از جمله چند شکلی‌های (پلی‌مورفیسم) تک نوکلئوتیدی در بروز سنگ کلیه تأثیرگذارند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین ارتباط چندشکلی T/C در نوکلئوتید ۴۰۶۵+ ناحیه غیرترجمه‌شونده ۳'UTR (untranslated region'۳) ژن اوروکیناز (rs) ۴۰۶۵ با احتمال ایجاد سنگ‌های کلسیمی کلیه انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۹۲ بر روی ۷۰ فرد با سابقه سنگ کلیه از نوع کلسیمی و ۷۰ فرد سالم به عنوان گروه شاهد در بیمارستان بقیه‌الله(عج) تهران انجام شد. چند شکلی با روش Allele specific PCR (AS-PCR) بررسی شد. فراوانی آللی و ژنوتیپی افراد با استفاده از جداول احتمالی و آزمون تعادل هاردی واینبرگ دو گروه با آزمون آماری کای دو مقایسه شدند.

یافته‌ها: در میان ۷۰ فرد بیمار ۱۰ نفر (۱۵٪) برای چند شکلی ژن اوروکیناز هتروزیگوت و ۲۴ نفر (۳۴٪) هموزیگوت بودند. ۲۵ نفر از افراد شاهد (۳۵٪) برای این چند شکلی هتروزیگوت بودند. فراوانی آلل T در افراد بیمار ٪۴۱ و در گروه شاهد ۱۸٪ بود. فراوانی آلل C در افراد بیمار ۵۹٪ و در گروه شاهد ۸۲٪ بود. کسر برتری (Odds ratio) نشان داد خطر ابتلا به سنگ‌های کلسیمی کلیه در افراد حامل این آلل ۱/۷ برابر بیش‌تر از افراد غیرحامل بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، به نظر می‌رسد بین چند شکلی ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز و ایجاد سنگ کلیه کلسیمی ارتباط معنی‌دار قابل توجهی وجود دارد. احتمالاً چند شکلی ژن اوروکیناز می‌تواند به عنوان یک ژن کاندید مؤثر در بروز سنگ کلیه کلسیمی معرفی شود.

کلیدواژه‌ها: چند شکلی‌های (پلی‌مورفیسم) تک نوکلئوتیدی، ناحیه غیرترجمه‌شونده، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه:

سنگ کلیه سومین بیماری شایع دستگاه ادراری در جهان است. حدود ۵ درصد از زنان و ۱۲ درصد از مردان در طول زندگی خود به سنگ کلیه مبتلا می‌شوند.[۱] شیوع سنگ کلیه در مناطق و گروه‌های مختلف ایران از ۱ تا ۸/۲ درصد متغیر است.[۲] سنگ‌های کلسیمی (اگزالات کلسیم و فسفات کلسیم) ۷۰ تا ۸۰ درصد سنگ‌های کلیه را شامل می‌شوند.[۳]

عوامل محیطی و ژنتیکی از جمله چند شکلی‌ها (پلی‌مورفیسم) در بروز سنگ کلیه تأثیرگذارند.[۴] چند شکلی‌ها تفاوت‌های تک بازی در بین ژنوم افراد مختلف هستند. با پیشرفت علم زیست کشاورزی، چند شکلی‌ها به عنوان نشان‌گرهای ژنتیکی حائز اهمیتی در نقشه‌برداری کلونی، مطالعه تکامل در بین گونه‌های مختلف و شناسایی بیماری‌های مرتبط با آلل‌های خاص مورد توجه قرار گرفتند.[۵] امروزه شواهد مهمی مبنی بر ارتباط چند شکلی‌های تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) با سنگ کلیه وجود دارد.[۱]

چند شکلی ژن اوروکیناز بارها در رابطه با بیماری‌های مختلف از جمله سنگ کلیه مورد مطالعه قرار گرفته

www.SID.ir

Archive of SID

است.[۱] ژن اوروکیناز روی موقعیت ۱۰q۲۴ قرار دارد. تری‌پوتی و همکاران اولین بار به وجود چند شکلی T/C در نوکلئوتید ۴۰۶۵+ ناحیه غیرترجمه‌شونده (untranslated region, ۳'UTR) ژن اوروکیناز پی بردند.[۱] براساس تحقیق‌های قبلی این جایگاه چند شکلی با بیماری‌های پیچیده‌ای چون سرطان مثانه، آرتریت روماتوئید، سرطان پروستات، سرطان دهان، بیماری آلزایمر و نفروپاتی ممبرانوس (یکی از شایع‌ترین علل سندرم نفروتیک و نارسایی کلیه) در ارتباط است.[۱و۶-۱۰] در بررسی تی‌سای و همکاران در چین، وجود آلل T در ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز خطر ابتلا به سنگ‌های کلسیمی کلیوی را تا دو برابر افزایش داد.[۹] ازتوک و همکاران نشان دادند که این چند شکلی در تشکیل سنگ کلیه در کودکان ترکیه نقش مهمی داشته است.[۱۱] بررسی داوی و همکاران در چین نیز نشان‌دهنده ارتباط چند شکلی ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز با بیماری سنگ کلیه بود.[۱] البته برخی از مطالعه‌ها این رابطه را نقض می‌کنند.[۱۲]

از آن‌جا که این ارتباط تاکنون در جمعیت ایرانی بررسی نشده است، مطالعه حاضر با هدف تعیین ارتباط چند شکلی T/C در نوکلئوتید ۴۰۶۵+ ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز با احتمال ایجاد سنگ‌های کلسیمی کلیه انجام شد.

❋مواد و روش‌ها:

این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۱۳۹۲ در آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک بیمارستان بقیه‌الله(عج) تهران انجام شد. یک جامعه ۱۴۰ نفری متشکل از ۷۰ فرد بیمار با سابقه سنگ کلیه از نوع کلسیمی و ۷۰ فرد شاهد به طور تصادفی از بین مراجعین بیمارستان بقیه‌الله(عج) انتخاب شدند. با همکاری متخصصین دستگاه ادراری بیمارستان مذکور سعی شد افراد بیمار و شاهد از مناطق مشابه استان تهران از نظر ویژگی‌هایی چون اقلیم و آب آشامیدنی انتخاب شوند. محدوده سنی افراد دو گروه بین ۳۰ تا ۶۰ سال در نظر گرفته شد. از آنجا که ۷۰ تا ۸۰ درصد سنگ‌های کلیه ترکیب کلسیمی دارند و مطالعه‌ها اهمیت ژنتیک را در ایجاد این نوع سنگ‌ها نشان داده‌اند،[۱و۹،۱۱و۱۲] در این مطالعه نیز سنگ‌های کلسیمی بررسی شدند.

افرادی که مایعات کم (کم‌تر از ۱/۵ لیتردر روز) یا کلسیم زیاد (بیش‌تر از ۱۵۰۰ میلی‌گرم در روز) مصرف می‌کردند یا مبتلا به بیماری‌های مستعدکننده بودند، از مطالعه خارج شدند. از همه افراد ۱۰میلی‌لیتر نمونه خون گرفته و ژنوم آن‌ها با کیت استخراجی ستونی Gene-All استخراج شد. جهت شناسایی چند شکلی از روش AS-PCR استفاده شد. روش AS-PCR که با عنوان ARMS (Amplification-refractory mutation system) نیز خوانده می‌شود، در مواقعی استفاده می‌شود که به علت نوع ترکیب توالی، هیبریداسیون اختصاصی با نشان‌گر ممکن نباشد. مزیت استفاده از این روش نسبت به سایر روش‌ها تشخیص سریع، دقیق و هزینه کم‌تر آن است.[۱۳و۱۴] در این روش برای هر فرد دو واکنش PCR انجام می‌شود. یکی از پرایمرها در هر دو واکنش ثابت بوده و پرایمر دیگر در یک واکنش PCR به صورت طبیعی (مکمل با الگو) و در یک واکنش دارای چند شکلی مورد نظر در ناحیه ۳' بود.[۱۳]

واکنش PCR در این بررسی در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر بافر شرکت سیناژن (حاوی DNA پلیمراز ۰/۰۸ واحد بر میکرولیتر، منیزیم کلراید ۱/۵ میلی‌مولار، نوکلئوتید تری‌فسفات ۰/۰۴ میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر DNA ژنومی استخراج شده و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱ میکرومولار بود. در این بررسی طراحی پرایمر با استفاده از نرم‌افزار آن‌لاین پرایمر ۳+ انجام شد. سپس پرایمرهای طراحی شده با نرم‌افزارهای الیگوآنالیزر و UCSC تحلیل شدند. توالی پرایمرها عبارت بود از:

F: ۵'- CTT TGA CTG GGA AAC TCT TC-۳'
R1: ۵'- GTT AAA GCT ATT GTC GTT CG-۳'
R2: ۵'- GGT AAA GCT ATT GTC GTT C**A**-۳'
(F: پرایمر پیش‌رونده مشترک، R1: پرایمر معکوس طبیعی و R2: پرایمر معکوس دارای چند شکلی)

www.SID.ir

Archive of SID

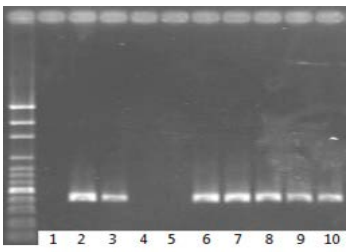
مراحل واکنش PCR مطابق برنامه زیر در دستگاه Flexy cycler PCR انجام شد:

۱ دور واسرشتگی اولیه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه، ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، مرحله اتصال پرایمرها ۱ دقیقه در ۶۷/۵ درجه و مرحله گسترش ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه و در نهایت ۱ دور گسترش نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه.

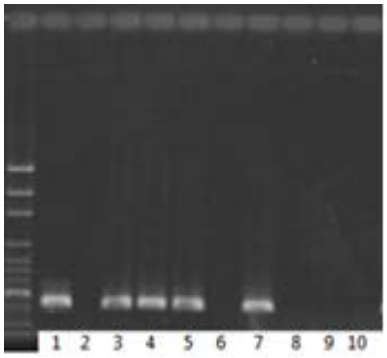
سپس محصولات PCR با ژل آگارز ۰/۵ درصد الکتروفورز و توسط اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شدند. این محصولات با دستگاه تشخیصی نور ماورابنفش به صورت تک باند ۴۴۳ بازی دیده شدند. سپس داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۱۶ تحلیل و فراوانی آللی و ژنوتیپی افراد با استفاده از جداول احتمالی مقایسه شد. آزمون تعادل هاردی واینبرگ برای دو گروه با استفاده از آزمون کای دو انجام شد (اگر آلل بیماری‌زا در جمعیت با بیماری مرتبط باشد، تعادل هاردی واینبرگ در جمعیت بیماران برقرار نیست).[۱۵] کسر برتری (Odds ratio) برای افراد بیمار حامل آلل بیماری‌زا نسبت به افراد بیمار غیرحامل محاسبه شد.

❋یافته‌ها:

نتایج الکتروفورز محصولات PCR برای هر فرد با پرایمرهای پیشرونده و معکوس طبیعی ژن اوروکیناز و همچنین پرایمرهای پیشرونده طبیعی و معکوس جهش یافته این ژن مشخص شد (شکل‌های شماره ۱ و ۲). با توجه به شکل‌ها افراد ۲، ۶، ۸، ۹ و ۱۰ ژنوتیپ طبیعی، افراد ۳ و ۷ ژنوتیپ هتروزیگوت و افراد ۱، ۴ و ۵ از نظر جهش ۳'UTR ژن اوروکیناز ژنوتیپ هموزیگوت داشتند.



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR با پرایمرهای مستقیم و معکوس طبیعی برای ۱۰ نفر از گروه بیمار



شکل۲- الکتروفورز محصولات PCR با پرایمر مستقیم طبیعی و پرایمر معکوس دارای جهش T/C در سر ′۳ برای ۱۰ نفر از گروه بیمار

هیچ فردی در گروه شاهد با ژنوتیپ هموزیگوت TT (ژنوتیپ بیمار) وجود نداشت. در میان افراد بیمار، ۲۳ نفر با ژنوتیپ هموزیگوت TT یافت شدند که این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). مقدار کسر برتری نیز ۱/۷ محاسبه شد؛ یعنی خطر ابتلا به سنگ‌های کلسیمی کلیه در افراد حامل آلل بیماری‌زا (T) در این بررسی ۱/۷ برابر بیش‌تر از افراد غیرحامل بود (OR:۱/۷ ؛ ۹۵٪ C1=۰/۲۹۸۸-۱/۱۵۸) (جدول شماره ۱).

جدول ۱- فراوانی ژنوتیپی چند شکلی ۳'UTR ژن اوروکیناز در افراد بیمار و شاهد برحسب جنسیت (هر گروه ۷۰ نفر)

گروه		TTهموزیگوت		C/Tهتروزیگوت		CC طبیعی		سطح معنی‌داری
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
بیمار	مرد	۱۱	۳۱	۷	۲۰	۱۷	۴۹	
	زن	۱۲	۳۴	۴	۱۲	۱۹	۵۴	
	کل	۲۳	۳۳	۱۱	۱۶	۳۶	۵۱	
شاهد	مرد	۰	۰	۱۵	۴۳	۲۰	۵۷	۰/۰۱۶
	زن	۰	۰	۱۰	۲۹	۲۵	۷۱	۰/۰۰۵
	کل	۰	۰	۲۵	۳۶	۴۵	۶۴	۰/۰۰۱

فراوانی آلل T (آلل بیماری‌زا) در افراد بیمار ۴۱ درصد و در افراد شاهد ۱۸ درصد و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲- فراوانی چند شکلی ۳'UTR T/C ژن اوروکیناز در افراد بیمار و شاهد

گروه	فراوانی آلل T		فراوانی آلل C		سطح معنی‌داری
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
بیمار	۵۸	۴۱	۸۲	۵۹	۰/۰۰۰۲
شاهد	۲۵	۱۸	۱۱۵	۸۲	

محاسبه مقدار کای دو نشان داد که گروه شاهد در تعادل هاردی واینبرگ بود، ولی گروه بیمار از تعادل هاردی واینبرگ پیروی نمی‌کرد. تعادل هاردی واینبرگ جمعیت از لحاظ مدل‌های ژنتیکی مختلف در سطح ۹۵ درصد برای مدل ژنتیکی مغلوب (Recessive) معنی‌دار بود؛ بدین معنا که وجود دو نسخه از آلل معیوب برای بروز بیماری در جمعیت لازم بود.

❋بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد فراوانی آلل T (آلل بیماری‌زا) در نوکلئوتید ۴۰۶۵+ ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز در افراد بیمار دارای سنگ کلیه کلسیمی در مقایسه با افراد شاهد، بیش‌تر بود. شواهد حاکی از احتمال ارتباط وجود چند شکلی C/T مذکور در ژن اوروکیناز با ایجاد سنگ‌های کلسیمی در جمعیت استان تهران بود.

برخی از مطالعات این چندشکلی را افزایش خطر برای سنگ کلیه معرفی کرده‌اند،[۱،۹و۱۱] در حالی‌که برخی مطالعات دیگر ارتباط میان این چندشکلی و سنگ کلیه را نفی کرده‌اند.[۱۲] این اختلاف می‌تواند به علت تفاوت در معیارهای انتخاب بیماران و گروه شاهد باشد.

در مطالعه داوی و همکاران در چین، وجود چند شکلی C/T در ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز خطر ابتلا به سنگ‌های کلسیمی کلیه را افزایش می‌داد. این چندشکلی به خصوص در مناطق آسیایی با افزایش تکرار سنگ‌سازی کلیه مرتبط بود. این بررسی با روش RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) انجام شد. اگرچه روش AS-PCR روش سریع و ارزانی است، اما در بعضی مواقع به منظور پیشگیری از عدم تطبیق‌های احتمالی، روش RFLP-PCR جای‌گزین مناسبی است. داوی عدم عملکرد ژن اوروکیناز و تشکیل سنگ‌های کلسیمی کلیه را ناشی از قرار گرفتن این چند شکلی در ناحیه ۳'UTR دانست؛ چون توالی ۳'UTR نقش مهمی در تنظیم بیان ژن دارد.[۱]

در مطالعه کیم و همکاران با استفاده از روش RFLP-PCR در کره، ارتباط معنی‌داری میان چند شکلی ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز و ایجاد سنگ‌های کلسیم اگزالاتی یافت نشد. فراوانی آلل T برای جایگاه ۳'UTR ژن اوروکیناز در آن مطالعه در افراد بیمار ۷۱/۳ درصد و در گروه شاهد ۶۸/۹ درصد بود. فراوانی آلل C در افراد بیمار ۲۸/۷ درصد و در گروه شاهد ۳۱/۱ درصد محاسبه شد. آن‌ها احتمال دادند که این نتیجه ناشی از تفاوت‌های نژادی میان افراد جمعیت‌های مختلف است.[۱۲]

البته باید دقت داشت که جهت ارتباط یک بیماری با یک عامل ژنتیکی به انجام بررسی‌های کامل در جمعیت‌های مختلف نیاز است و نمی‌توان به راحتی ژنتیکی بودن یک فنوتیپ خاص را با انجام چند مطالعه محدود در جمعیت‌های خاص نتیجه گرفت.

یکی از محدودیت‌های مهم مطالعه حاضر، عدم بررسی ارتباط سایر شاخص‌های متابولیکی آسیب‌شناسی و چندشکلی مورد نظر بود. با توجه به حساسیت مطالعه و علی‌رغم هزینه بسیار بالای این دسته از تحقیقات، در صورت استفاده از روش‌های تأییدی هضم آنزیمی می‌توان به صحت بیش‌تر یافته‌ها کمک کرد. همچنین با استفاده از روش‌هایی مانند LNA (locked nucleic acid)[۱۶] می‌توان اختصاصیت روش AS-PCR را بالا برد.

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر، انتظار می‌رود چندشکلی ناحیه ۳'UTR ژن اوروکیناز بتواند به‌عنوان یک نشان‌گر در شناسایی افراد مستعد ابتلا به سنگ کلیه، استفاده شود.

❋سپاس‌گزاری:

از همکاری کارشناسان آزمایشگاه تحقیقاتی ژنتیک دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله به ویژه خانم احمدی تشکر می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

❋مراجع:

1. Li D, Liu J, Ren J, Yan L, Liu H, Xu Z. Meta-analysis of the urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism and susceptibility to urolithiasis. Biomed Rep 2013 May; 1 (3): 369-74.

2. Rafiei H, Malekpoor F, Amiri M, Rahimi Madiseh M, Lalegani H. Kidney stone development among Older Adults in Iran. J Indian Acad Geriatr 2014; 10: 10-3.

3. Lai K, Lin WY, Man KM, Tsai CH, Chen HY, Tsai FJ, et al. Association of interleukin-18 gene polymorphisms with calcium oxalate kidney stone disease. Scand J Urol Nephrol 2010 Feb; 44 (1): 20-6.

4. Mittal RD, Mishra DK, Srivastava P, Manchanda P, Bid HK, Kapoor R. Polymorphism in the vitamin D receptor and the androgen receptor gene associated with the risk of urolithiasis. Indian J Clin Biochem 2010 Apr; 25 (2): 119-26.

5. Krieger NS, Bushinsky DA. The relation between bone and stone formation. Calcif Tissue Int 2013 Oct; 93 (4): 374-81.

6. Segarra A, Jatem E, Quiles M**T**, Arbós MA, Ostos H, Valtierra N, et al. Diagnostic value of soluble urokinase - type plasminogen activator receptor serum levels in adults with idiopathic nephrotic syndrome. Nefrologia 2014; 34 (1): 46-52.

7. Manchanda PK, Bid HK, Mittal RD. Association of urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism with bladder cancer. Urol Int 2006; 77 (1): 81-4.

8. Mihailova A, Mikazane H, Klovins J, Ņikitina - Zake L. Interleukin 18 gene promoter polymorphisms in Latvian patients with rheumatoid arthritis. Proc Latvian. Acad Sci 2011 Jan; 65 (1): 1-6.

9. Chen CH, Chen SY , Shu KH, Wen MC, Cheng CH , Wu MJ, et al. Urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism is associated with malignancy and ESRD in idiopathic membranous nephropathy. Biomed Res Int 2014; 2014: 425095.

10. Ozturk A, Minster RL, DeKoshy ST, Kamboh MI. Association of tag SNPs in the urokinase - plasminogen activator (PLAU) gene with Alzheimer's disease and associated quantitative traits. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2007 Jan 5; 144B (1): 79-82.

11. Ozturk M, Kordan Y, Cangul H, Serkin H, Kilicarslan H, Vuruskan H, et al. Association of urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism with calcium oxalate urolithiasis in children. Int Urol Nephrol 2008; 40 (3): 563-8.

12. Kim JY, Kim YS, Chang IH, Kim TH , Kim HR. Interleukin-1β, calcium-sensing receptor, and urokinase gene polymorphisms in Korean patients with urolithiasis. Korean J Urol 2011 May; 52 (5): 340-4.

13. Marini M, Sasongko TH, Watihayati MS, Atif AB, Hayati F; Gunadi, Zabidi - Hussin ZA, et al. Allele - specific PCR for a cost-effective & time - efficient diagnostic screening of spinal muscular atrophy. Indian J Med Res 2012; 135: 31-5.

14. Singh J, Birbian N, Sinha S, Goswami A. A critical review on PCR, its types and applications. Int J Adv Res Biol Sci 2014; 1 (7): 65-80.

15. Lewis CM. Genetic association studies: Design, analysis and interpretation. Brief Bioinform 2002 Jun; 3 (2): 146-53.

16. Latorra D, Campbell K, Wolter A, Hurley JM. Enhanced allele - specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. Hum Mutat 2003; 22 (1): 79-85.

www.SID.ir