

Study of 4G/5G Mutations Prevalence in Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene in Iranian Women with Ectopic PregnancyZahra Sadeghi¹, Ahmad Ebrahimi^{2*}, Fateme Davari Tanha³, Seyed Yousef Seyedena⁴

1. MSc of Genetics, Department of Cellular and Molecular, Faculty of Biology Sciences, Tehran-North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, PhD of Molecular Genetics, Post-doctoral of Genetic Complex Diseases, Cellular and Molecular Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Associate Professor, MD, Specialist of Obstetrics and Gynecology, Fellowship of Infertility, Department of Obstetrics & Gynecology, Vali-e-Asr Reproductive Health Center, Faculty of Medical Sciences, University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Associate Professor, PhD of Human Genetics, Department of Cellular and Molecular, Faculty of Biology Sciences, Tehran-North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 18 Jun 2017, Accepted: 6 Sep 2017

Abstract

Background: Ectopic pregnancy is a type of pregnancy in which implantation of zygote occurs out of the uterine cavity. One of the most important problems is bleeding. On the other hand, Plasminogen Activator Inhibitor-1(PAI-1) gene is one of the involved factors in unsuccessful pregnancies, and 4G/5G polymorphism is the most common changes of this gene. So, it is important to study the prevalence of these changes in this gene in women with ectopic pregnancy.

Materials and Methods: In this case-control study, 100 Iranian women with ectopic pregnancy and 101 Iranian women with the normal pregnancy were selected. After blood sampling, ARMS PCR method has been used for detection 4G/5G polymorphism and data were analyzed by statistical analysis.

Results: In this study, 4G allele with 70.79% prevalence and 5G allele with 63.5% prevalence are the most common alleles for the control and case group, respectively. 4G/4G and 4G/5G genotypes in the control group and 4G/5G and 5G/5G genotypes in the case group are prevalent. An Armitage test found $p < 0.05$ for both alleles, showing 4G allele ($p = 1.524e-10$; OR = 0.262) has decreasing effect and 5G allele ($p = 1.524e-10$; OR = 3.822) has increasing effect in ectopic pregnancy.

Conclusion: According to the findings, 5G allele and 4G/5G and 5G/5G genotypes have increasing effect, 4G allele and 4G/4G genotype have decreasing effect in ectopic pregnancy. So, we could consider 5G allele as a risk factor of ectopic pregnancy in this study.

Keywords: Ectopic Pregnancy, Plasminogen Activator Inhibitor 1, Polymorphism, rs1799889.

*Corresponding Author:

Address: Yas (Mirza Kuchak Khan) Women Hospital, North Ostad Nejatollahi Street, Karimkhane Zand Street, Tehran, Iran.

Email: ae35m@yahoo.com

بررسی شیوع جهش 4G/5G در ژن Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) در زنان ایرانی مبتلا به بارداری خارج رحمی

زهرا صادقی^۱، احمد ابراهیمی^{۲*}، فاطمه داوری تنها^۳، سید یوسف سیدنا^۴

۱. کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲. استادیار، دکتری ژنتیک مولکولی پزشکی، پسا دکترای بیماری‌های پیچیده ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. دانشیار، متخصص زنان و زایمان-فلوشیپ نازایی، گروه زنان و مامایی، بیمارستان زنان و مرکز تحقیقات باروری ولیعصر، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران.
۴. دانشیار، دکتری ژنتیک انسانی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۲۸، تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: بارداری خارج رحمی نوعی حاملگی است که در آن، لانه‌گزینی تخم، خارج از محدوده‌ی رحم اتفاق می‌افتد. یکی از مهم‌ترین مشکلات این بیماری خون‌ریزی است. از طرفی ژن فعال‌کننده مهارکننده پلازمینوژن نوع ۱ (PAI-1)، یکی از فاکتورهای دخیل در بارداری‌های ناموفق شناخته شده و پلی‌مورفیسم 4G/5G شایع‌ترین تغییر این ژن می‌باشد. بنابراین بررسی شیوع این تغییر در این ژن در زنان مبتلا به بارداری خارج رحمی دارای اهمیت است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه به روش مورد-شاهدی، ۱۰۰ زن ایرانی مبتلا به بارداری خارج رحمی و ۱۰۱ زن ایرانی سالم با بارداری موفق انتخاب شدند. پس از نمونه‌گیری خون، پلی‌مورفیسم 4G/5G با روش ARMS-PCR بررسی شد و داده‌ها با تحلیل‌های آماری مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این مطالعه آلل 4G با فراوانی ۷۰.۷۹ درصد و آلل 5G با فراوانی ۶۳.۵ درصد، بیشترین فراوانی را به ترتیب در گروه کنترل و بیمار داشتند. ژنوتایپ 4G/4G و 4G/5G در گروه کنترل و ژنوتایپ 5G/5G و 4G/5G در گروه بیمار بیشترین فراوانی را دارا هستند. با استفاده از آزمون آرمیتاژ مشخص شد که مقدار p معنادار بوده که نشان‌دهنده این است که آلل 4G (OR= ۰.۲۶۲)؛ $p= ۱.۵۲۴ \times 10^{-۱۰}$ اثر کاهشی و آلل 5G (OR= ۳.۸۲۲)؛ $p= ۱.۵۲۴ \times 10^{-۱۰}$ اثر افزایشی بر بیماری بارداری خارج رحمی دارد.

نتیجه‌گیری: بر طبق یافته‌ها، آلل 5G و ژنوتایپ‌های 4G/5G و 5G/5G، اثر افزایشی و آلل 4G و ژنوتایپ 4G/4G اثر کاهشی بر این بیماری دارد. در نتیجه در این مطالعه می‌توانیم آلل 5G را به عنوان ریسک فاکتور در بیماری بارداری خارج رحمی در نظر بگیریم.

واژگان کلیدی: بارداری خارج رحمی، پلی‌مورفیسم، ژن فعال‌کننده‌ی مهارکننده‌ی پلازمینوژن ۱، IS1۷۹۹۸۸۹.

*نویسنده مسئول: ایران، تهران، خیابان کریمخان زند، خیابان استاد نجات‌اللهی شمالی، بیمارستان فوق تخصصی زنان محب یاس (میرزا کوچک خان).

Email: ae35m@yahoo.com

مقدمه

بارداری خارج رحمی (EP) شایع‌ترین علت مرگ و میر مادران در سه ماهه اول بارداری است و ۴ تا ۱۰ درصد از مرگ و میرهای مرتبط با حاملگی را شامل می‌شود (۳-۱). بارداری خارج رحمی می‌تواند داخل لوله‌های رحمی (در نقاط مختلف)، سرویکس، اسکار سزارین، ناحیه تخمدانی، و شکمی رخ دهد (۴). گاهی بارداری در مکان ناشناخته (PUL) می‌تواند بارداری خارج رحمی باشد (۵). بارداری‌های هتروتوب (بارداری‌های همزمان داخل رحمی و خارج رحمی) نیز ۱ در هر ۴۰۰۰ در جمعیت عمومی رخ می‌دهد (۴). بارداری‌های خارج رحمی که در لوله فالوپ رخ می‌دهند، حداقل ۹۰ درصد موارد EP را به خود اختصاص داده که این رویداد به دلیل کاهش مژک‌های داخل لوله است. زنان سیگاری در خطر افزایش یافته‌ی بارداری خارج رحمی و بیماری‌های لوله‌ای رحمی هستند (۶، ۷). از جمله خطرات مهمی که زنان مبتلا به بارداری خارج رحمی را تهدید می‌کند، خونریزی در اثر پارگی لوله‌های فالوپ و یا در حین جراحی می‌باشد. علاوه بر آن، ممکن است مشکلات متعددی نظیر نازایی، سقط مکرر، و یا بارداری‌های ناموفق نیز ایجاد شود. استفاده از موارد کمک باروری و بارداری خارج از بدن، آسیب‌های لوله فالوپ و جراحی‌ها، التهاب و عفونت‌های لگنی، بارداری خارج رحمی قبلی، سابقه ناباروری قبلی، و فاکتورهای دیگری مثل سیگار کشیدن، سن بالای ۳۵ سال و روابط جنسی متعدد می‌تواند از ریسک فاکتورهای ابتلا به EP باشد (۴، ۸). علاوه بر موارد عنوان شده، عوامل ژنتیکی می‌توانند در ایجاد، درمان و یا استعداد ابتلا به EP دخیل باشند. از آنجایی که EP یکی از دلایل بارداری‌های ناموفق در زنان می‌باشد، و از طرفی، ارتباط واضحی بین فاکتورهای ژنتیکی موفقیت‌های بارداری، نازایی و ناباروری در مطالعات متعدد مشخص شده است، بررسی عوامل ژنتیکی مرتبط

با نازایی، ناباروری و بارداری‌های ناموفق، به عنوان فاکتور خطر احتمالی در ایجاد استعداد ابتلا و یا درمان EP می‌تواند ارزشمند باشد. شایع‌ترین عوامل خطر ژنتیکی مورد بررسی در بارداری‌های ناموفق فاکتورهای انعقادی به ویژه ژن PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor type-1) می‌باشد، که علاوه بر نقش واضح آن در بارداری‌های ناموفق، در پیش‌آگهی بارداری نیز نقش دارد. ژن PAI-1 ابتدا در دهه ۱۹۸۰ شناسایی و اولین بیمار دارای نقص این ژن در سال ۱۹۸۹ معرفی گردید (۹). ژن PAI-1 در مسیرهای انعقادی نقش دارد. این ژن، مهارکننده‌ی فعال کننده‌ی پلاسمینوژن است، جلوی خونریزی را گرفته و فیبرینولیز را بوسیله‌ی جلوگیری از حل شدن لخته‌ها تنظیم می‌کند (۱۰). این ژن که یک کمپلکس با فعال کننده پلاسمینوژن تیب بافتی (tPA) تشکیل می‌دهد، یکی از مهارکننده‌های قوی فیبرینولیز است (۱۱). ژن PAI-1 در 7q21.3-22 کروموزومی قرار دارد و جهش 4G/5G یکی از تغییرات مهم پلی‌مورفیک این ژن است که در ناحیه پروموتری این ژن قرار دارد (۱۰، ۱۲). هر دو ال 4G و 5G دارای ناحیه اتصالی برای یک فعال کننده رونویسی هستند. ال 5G ناحیه اتصالی دیگری برای یک مهارکننده نیز دارد (۱۱، ۱۳). ژنوتایپ 4G/4G با افزایش فعالیت PAI-1 و جلوگیری از فیبرینولیز همراه بوده و کاهش سطح پلاسمایی PAI-1 موجب افزایش فعالیت فیبرینولیتیکی و افزایش خونریزی می‌گردد (۹، ۱۴).

مطالعات انجام شده بر روی این پلی‌مورفسم نشان داد که جهش در این ژن با سرطان اندومتر (۱۵)، استعداد ابتلا به سرطان تخمدان (۱۶)، از دست رفتن حاملگی مکرر (RPL) (۱۷) و اندومتريوز (۱۸) ارتباط معناداری نشان داده که در تمام موارد ال 4G به عنوان ریسک فاکتور در نظر گرفته شده است. این بیماری‌ها بویژه اندومتريوز می‌تواند به نوعی زمینه ساز ایجاد EP باشند، و EP به عنوان یکی از دلایل

بارداری‌های ناموفق می‌تواند متأثر از عملکرد این فاکتور باشد. بررسی انجام شده روی بیان ژن PAI-1 در بارداری‌ها نشان داد که بیان این ژن در بارداری‌های نرمال در مقایسه با بارداری‌های خارج رحمی بیشتر می‌باشد (۱۹). با توجه به بررسی‌های انجام گرفته، به نظر می‌رسد در زنان ایرانی هم این بررسی مفید واقع شود و ما را در شناخت مکانیسم ایجاد EP یاری کند. مطابق با ارتباطی که ژن PAI-1 با بارداری‌های ناموفق نشان داده است، می‌توان اینگونه بیان نمود که این ژن یکی از فاکتورهای دخیل در شکست بارداری‌ها می‌باشد. بر این اساس با هدف بررسی پلی‌مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 به عنوان یکی از عوامل بارداری ناموفق، در زنان ایرانی مبتلا به بارداری خارج رحمی، برای اولین بار ارتباط اللی و ژنوتایی این ژن با بیماری EP بررسی گردید، تا در صورت امکان با پیش آگهی لازم به بیماران دارای جهش و به عنوان مارکر در پیشینی آینده بارداری، از خطر رخداد مجدد بیماری جلوگیری کرده و بتوان راهکارهای درمانی را برای بیماران به کار برد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت موردی شاهدی، بر روی ۱۰۰ نفر از زنان ایرانی با سابقه حداقل یک بار بارداری خارج رحمی، مراجعه کننده به بیمارستان فوق تخصصی و جامع زنان یاس و ۱۰۱ نفر زن سالم با حداقل یک بارداری موفق و بدون سابقه ابتلا به بارداری خارج رحمی صورت گرفت. مطابق با رعایت اخلاق در پزشکی، سلامت بیمار برای انجام نمونه‌گیری در اولویت بوده و هیچگونه هزینه‌ای بابت گرفتن نمونه خون از بیماران دریافت نگردید. اطلاعات شخصی بیماران مبنی بر اطلاعاتی که برای انجام این پروژه دریافت گردید به صورت محرمانه نگهداشته می‌شود و اسامی آن‌ها تحت اختیار افراد غیر مسئول قرار داده نخواهد شد. پس از خون‌گیری و استخراج DNA و کیفیت سنجی، بررسی مولکولی پلی‌مورفیسم 4G/5G

در ژن PAI-1 با تکنیک ARMS PCR انجام شد که به شرح زیر است.

نمونه‌گیری و استخراج DNA

مقدار ۳ تا ۵ سی‌سی نمونه خون تام از تمامی افراد به تفکیک گروه و سوابق بالینی صورت گرفته و DNA آن‌ها با روش دستی با کلروفورم استخراج شد و پس از کیفیت سنجی با دستگاه نانودراپ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده جهت جایگاه پلی‌مورفیسمی 4G/5G در ژن PAI-1 به روش ARMS PCR مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات پرایمرها در جدول ۱ ذکر گردیده است. نحوه استخراج به این صورت است که مقدار ۵۰۰ میکرولیتر خون با ۸۵۰ میکرولیتر آب مقطر، پیتاژ و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با دور ۹۰۰۰ بر دقیقه قرار داده شد. با خالی کردن مایع رویی، این مرحله سه بار تکرار گردید. مقدار ۳۰۰ میکرولیتر Nlysis به رسوب اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در ترموبلاک با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر NaCl-5M اضافه گردید.

در مرحله آخر ۶۵۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه شده و نمونه‌ها ۵ دقیقه در دستگاه الکتروفورز با دور ۷۰۰۰ بر دقیقه قرار داده شدند. سه فاز تشکیل شد که فاز رویی حاوی DNA بود. برای تغلیظ DNA از الکل ۹۸ درصد به مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر استفاده و به مدت ۱ ساعت در -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و بعد از آن ۲ دقیقه در دور ۱۰۰۰ بر دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از خالی کردن مایع رویی، ۲۵۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد به رسوب اضافه و با دور ۱۰۰۰ بر دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از خالی کردن مایع رویی، این مرحله سه بار تکرار شد و به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه داخل ترموبلاک با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و در نهایت، ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه گردید.

انجام PCR و الکتروفورز

برای این بررسی، از روش ARMS PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده (از شرکت Microgene) برای PAI-1 4G/5G استفاده شد (جدول ۱). مقدار ۱/۷ میکرولیتر پرایمر، ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۳.۵ میکرولیتر DNA فریزه Master (حاوی dNTP، آنزیم، MgCl₂ و بافر) در این PCR استفاده شد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

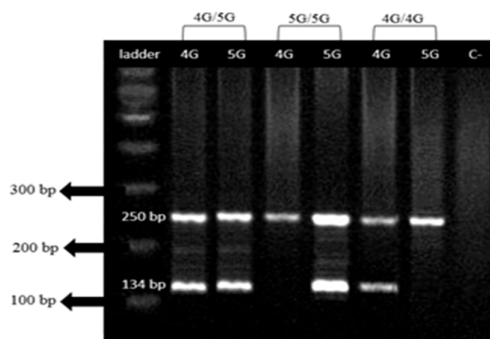
تکثیر در ۳۲ سیکل (دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، واسرشت در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۳ ثانیه، و طویل شدن در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه) انجام گردید. طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شده، سپس با الکتروفورز افقی توسط رنگ آمیزی سوپریور ژلرد، با ژل آگارز ۲ درصد تایید شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای طراحی شده برای پلی مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1

	۵' به ۳'
Forward 4G	GTC TGG ACA CGT GGG GA
Forward 5G	GTC TGG ACA CGT GGG GG
Forward خارجی	GCT TTT ACC ATG GTA ACC CCT G
Reverse خارجی	GCC AGC CAC GTG ATT GTC TAG

تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها و فراوانی اللی و ژنوتایپی PAI-1 در ژن 4G/5G توسط آزمون K₂ و آزمون Armitage بین گروه موردی و شاهدی مقایسه گردید. سطح معناداری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد و محاسبات با استفاده از OR و CI 95% برای بررسی ارتباط بین این پلی مورفیسم و بیماری بارداری خارج رحمی انجام گردید.



شکل ۱. چاهک اول و دوم، حالت هتروزیگوت را نشان می‌دهند (دو باند ۱۳۴ bp و باندهای کنترل ۲۵۰ bp). چاهک سوم و چهارم، 5G/5G را نشان می‌دهد (یک باند ۱۳۴ bp و باندهای کنترل ۲۵۰ bp). چاهک پنجم و ششم، 4G/4G را نشان می‌دهد (یک باند ۱۳۴ bp و باندهای کنترل ۲۵۰ bp). چاهک انتهایی -C، کنترل منفی است. در این بررسی، از ۱۰۰ Ladder استفاده شده است.

یافته‌ها

مطالعه مولکولی تعیین فراوانی پلی مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 بر روی ۲۰۱ نمونه DNA بررسی گردید. در شکل ۱، تعداد باندها و طول قطعات در ژل الکتروفورز مشخص شده است.

با توجه به جداول ۲ و ۳ که به ترتیب فراوانی ژنوتایپی و آللی را نشان می‌دهند، ال 4G و ژنوتایپی 4G/4G دارای بیشترین فراوانی هستند. در گروه افراد

بیمار، ژنوتایپ 4G/5G و در گروه کنترل ژنوتایپ 4G/4G بیشترین فراوانی را دارند. هم چنین آلل 5G در گروه بیمار و الل 4G در گروه کنترل دارای شیوع بالایی هستند.

جدول ۲. فراوانی ژنوتایپی پلی مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 در زنان بیمار و کنترل

	4G/4G (%)	4G/5G (%)	5G/5G (%)
بیمار (تعداد=۱۰۰)	۱۱ (۱۱)	۵۱ (۵۱)	۳۸ (۳۸)
کنترل (تعداد=۱۰۱)	۵۵ (۵۴/۵)	۳۳ (۳۲/۷)	۱۳ (۱۲/۹)

جدول ۳. فراوانی اللی پلی مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 در زنان بیمار و کنترل

	4G (%)	5G (%)
بیمار (تعداد=۲۰۰)	۷۳ (۳۶/۵)	۱۲۷ (۶۳/۵)
کنترل (تعداد=۲۰۲)	۱۴۳ (۷۰/۷۹)	۵۹ (۲۹/۲۰۷)

همان طور که در جدول ۴ نشان داده شده است، آنالیز انحراف از تعادل هاردی واینبرگ برای جمعیت بیمار و کنترل انجام گردیده است. جمعیت کنترل از تعادل هاردی واینبرگ پیروی نمی کند، این مساله نشان می دهد که گروه کنترل دارای توزیع نرمال نمی باشد که با توجه به نوع نمونه گیری که جامعه در دسترس است و تعداد کم نمونه و سطح معناداری مشاهده شده، منطقی به نظر می رسد.

با توجه به جداول فوق، آلل 5G بیشترین فراوانی را در گروه بیمار دارد. مطابق جدول ۵، بین گروه بیمار و کنترل اختلاف معناداری مشاهده گردید. الل 5G (۳۸۲۲) ; $OR=10-e^{-1.524}$ (p) در این بررسی به عنوان ریسک فاکتور در بیماری بارداری خارجی رحمی شناخته شد و نشان داده شد که الل 4G (۰.۲۶۲) ; $OR=10-e^{-1.524}$ (p) اثر محافظتی دارد.

جدول ۴. آزمون انحراف از تعادل هاردی واینبرگ

SNP	کنترل	بیمار
PAI-1 4G/5G	5G/5G	(۴۰/۳۲)۳۸
	4G/5G	(۴۶/۳۵)۵۱
	4G/4G	(۱۳/۳۲)۱۱
	$f_{al} = 0.29+/-0.035$	$f_{al} = 0.64+/-0.032$
	$F = 0.20991$	$F = 0.10020$
	$P = 0.034897$ (Pearson)	$P = 0.316320$ (Pearson)
	$P = 0.038565$ (L1r)	$P = 0.313052$ (L1r)
	$P = 0.051448$ (Exact)	$P = 0.391355$ (Exact)

جدول 5. بررسی روابط اللی و ژنوتایپی پلی مورفیسم 4G/5G ژن PAI-1 در گروه بیمار و سالم

تست برای ارتباط (C.I. 95%)				
آزمون Armitage	مثبت بودن اللی	هموزیگوس	هتروزیگوس	اختلاف فرکانس آلی
ریسک آل 4G				
5G/5G <-> 5G/4G+4G/4G	5G/5G <-> 4G/4G	5G/5G <-> 5G/4G	5G <-> 4G	common adds ratio
Odds_ratio= ۰/۲۴۱	Odds_ratio= ۰/۰۶۸	Odds_ratio= ۰/۵۲۹	Odds_ratio= ۰/۲۷۳	Odds_ratio= ۰/۲۶۲
C.I.= [۰/۱۱۹-۰/۴۹۰]	C.I.= [۰/۰۲۸-۰/۱۹۶]	C.I.= [۰/۲۴۶-۱/۱۳۸]	C.I.= [۰/۱۵۶-۰/۳۶۰]	C.I.= [۰/۱۱۹-۰/۴۹۰]
chi2= ۱۶/۷۶	chi2= ۳۹/۵۵	chi2= ۲/۶۹	chi2= ۴۷/۵۴	chi2= ۴۱
p= ۰/۰۰۰۰۴	p= ۳/۲۰۵ e ^{-۱۰}	p= ۰/۱۰۱۰۷	p= ۵/۳۹۹ e ^{-۱۲} (P)	p= ۱/۵۲۴ e ^{-۱۰}
ریسک آل 5G				
4G/4G <-> 5G/5G+5G/4G	4G/4G <-> 5G/5G	4G/4G <-> 5G/4G	4G <-> 5G	common adds ratio
Odds_ratio= ۹/۶۷۴	Odds_ratio= ۱۴/۶۱۵	Odds_ratio= ۷/۷۲۷	Odds_ratio= ۴/۲۱۷	Odds_ratio= ۳/۸۲۲
C.I.= [۴/۶۲۱-۲۰/۱۲۵۰]	C.I.= [۵/۹۲۴-۳۶/۰۶۱]	C.I.= [۳/۵۳۷-۱۶/۸۸۳]	C.I.= [۲/۷۷۶-۶/۴۰۶]	C.I.= [۴/۶۲۱-۲۰/۱۲۵۰]
chi2= ۴۳/۰۳	chi2= ۳۹/۵۵	chi2= ۲۹/۵۷	chi2= ۴۷/۵۴	chi2= ۴۱
p= ۵/۴۰۲ e ^{-۱۱}	p= ۳/۲۰۵ e ^{-۱۰}	p= ۵/۳۸۷ e ^{-۸}	p= ۵/۳۹۹ e ^{-۱۲} (P)	p= ۱/۵۲۴ e ^{-۱۰}

بازه اطمینان CI:

سطح معناداری: p < ۰/۰۵

بحث

در این مطالعه به بررسی شیوع اللی و ارتباط بین پلی مورفیسم 4G/5G در ژن PAI-1 و بیماری بارداری خارج رحمی پرداختیم و اثر هر ال را، روی افزایش یا کاهش بیماری مذکور بررسی کردیم. این مطالعه برای اولین بار در جمعیت زنان ایرانی انجام شده و مطالعه دیگری تا کنون مبنی بر ارتباط اللی و ژنوتایپی بین ژن 4G/5G PAI-1 و بیماری بارداری خارج رحمی گزارش نشده است. بر اساس آنالیزهای انجام شده، بین گروه مورد و شاهد از لحاظ شیوع اللی و ژنوتایپی تفاوت معناداری مشاهده گردید و بین پلی مورفیسم مذکور و بیماری بارداری خارج رحمی ارتباط معناداری وجود داشت.

در گروه بیمار، فراوانی ال 5G بالا بوده و همانطور که در جدول شماره 5 به آن اشاره شده است، این ال با سطح معناداری بسیار بالا (OR= ۴.۲۱۷) باعث افزایش بیماری شده و میتوان ال 5G را در این بیماری به عنوان ریسک فاکتور در نظر گرفت. ال 5G سبب افزایش فیبرینولیز و در نتیجه افزایش خونریزی

می شود، که یکی از مشکلات زنان مبتلا به EP، خونریزی های شدید است. هم چنین ال 4G با سطح معناداری بالا (OR=۰.۲۳۷؛ ۹۵%CI: ۰.۱۵۶-۰.۳۶۰)؛ اثر محافظتی (protective) را در بیماری بارداری خارج رحمی نشان داد. یافته ها نشان داد که در حالت هتروزیگوت، هنگامی که یکی از ال ها 5G باشد، (OR=۷.۷۲۷)؛ ۹۵%CI: ۳.۵۳۷-۱۶.۸۸۳)؛ ریسک خطر ابتلا بیشتر می شود. هموزیگوسیتهی برای ال 5G با سطح معناداری بالا (P=۳.۲۰۵ e^{-۱۰}) ریسک ابتلا به بیماری بارداری خارج رحمی را بیشتر از حالت قبل افزایش داده، و در مقابل، هموزیگوسیتهی ال 4G، ریسک ابتلا را کاهش داده است. بررسی مشابهی در زمینه ی میزان بیان ژن PAI-1 در بیماری بارداری خارج رحمی مورد بررسی قرار گرفته است. مقاله ای تحت عنوان بررسی میزان بیان mRNA ژن PAI-1 در بارداری های داخل رحمی و خارج رحمی منتشر شد. این بررسی نشان می دهد که میزان بیان ژن PAI-1 در بارداری های خارج رحمی کمتر است و فعالیت فیبرینولیتیکی بیشتری در افراد مشاهده می شود. همچنین نشان می دهد که میزان بیان

PAI-1 در بارداری‌های نرمال بیشتر می‌باشد (۱۹). همانطور که گفته شد، ال 5G با فعالیت فیبرینولیتیکی مرتبط است و افزایش فعالیت PAI-1 پلازما، با ال 4G مرتبط می‌باشد. در بررسی دیگری نشان داده شد که میزان سطح PAI-1 پلازما می‌تواند در لانه گزینی در بخش‌های مختلف اثر بگذارد (۲۰). بررسی‌های مشابهی در مورد ارتباط ژن PAI-1 با بیماری‌های مختلف که باروری را در زنان تحت تاثیر قرار می‌دهد، انجام شده است. در زنان برزیلی مبتلا به اندومتروز مرتبط با نابآوری مطالعه‌ای بر این اساس انجام شد. در این بررسی، فراوانی ال 4G در زنان مبتلا به اندومتروز مرتبط با نابآوری ۵۷/۱ درصد و در افراد کنترل ۴۱/۲ درصد و فراوانی ال 5G نیز به ترتیب ۴۸/۹ و ۵۸/۸ درصد می‌باشد، که نشان دهنده‌ی این است که شیوع ال 4G در گروه بیمار و شیوع ال 5G در گروه کنترل بیشتر است. (۱۸). با توجه به این بررسی، پلی‌مورفیسم PAI-1 4G/5G ممکن است با ریسک اندومتروز مرتبط با نابآوری ارتباط داشته باشد. مطالعات متعددی بر بیماری اندومتروز انجام شده است. در یکی دیگر از مطالعات نشان داده شد که هیپوفیبرینولیز مرتبط با ال 4G، در زنان مبتلا به اندومتروز بیشتر است و فراوانی هموزیگوسیته ال 4G در گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۶۹/۳۳ و ۱۱/۶۲ درصد، و فراوانی هموزیگوسیته ال 5G در گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۲/۶۶ و ۵۵/۸۱ درصد می‌باشد که نشان دهنده‌ی شیوع بالای ژنوتایپ 4G/4G در گروه بیمار است (۲۱). بررسی‌های دیگر بر زنان مبتلا به RPL انجام شده است که نشان دهنده‌ی متفاوت بودن نتایج ما با بررسی‌های دیگر مقالات می‌باشد. در این بررسی‌ها ارتباط ژنوتایپ 4G/4G با RPL گزارش شده است. فراوانی ژنوتایپ 4G/4G در افراد کنترل ۳۱.۳٪ و در افراد بیمار ۴۱/۹ درصد بوده و هموزیگوسیته ال 5G در افراد کنترل و بیمار به ترتیب ۱۷/۲ و ۱۵/۳ درصد می‌باشد (۱۷). مطالعه‌ای در جمعیت

زنان ایرانی مبتلا به RPL نیز نشان داد که هموزیگوسیته ال 4G ریسک ابتلا به RPL را افزایش می‌دهد. در این بررسی، فراوانی ژنوتایپ 5G/5G در گروه کنترل بیشتر از گروه بیمار و هموزیگوسیته ال 4G در گروه بیمار بیشتر از گروه کنترل است. (۲۲). در بررسی دیگری نیز نشان داده شد که افرادی با ژنوتایپ 4G/4G در معرض خطر قابل توجهی برای بیماری سرطان اندومتريال هستند. فراوانی ال 4G در گروه بیمار و کنترل به ترتیب ۶۱/۶ و ۵۲/۲ درصد می‌باشد و فراوانی ال 5G در افراد بیمار و کنترل به ترتیب ۳۸/۴ و ۴۷/۸ درصد می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی شیوع بالای ال 4G در افراد بیمار و شیوع بالای ال 5G در افراد کنترل می‌باشد (۱۵). در مواردی که شکایت جدی (سقط‌های مکرر، از دست رفتن بارداری، مرگ‌های درون زهدانی) در رابطه با بارداری وجود دارد، نیز ارتباط با ژنوتایپ 4G/4G تائید شده است. هموزیگوسیته ال 5G و 4G در گروه بیمار به ترتیب ۲۶ و ۴۷ درصد است که نشان دهنده‌ی شیوع بالای ال 4G در گروه بیمار می‌باشد (۲۳). در مطالعه‌ی دیگری که بر روی زنان مبتلا به سقط خودبه خودی مکرر (RSA (Recurrent Spontaneous Abortion) انجام شد، نشان داد که در جمعیت ایرانی ژنوتایپ 4G/4G با سقط مرتبط است. این بررسی بیان می‌کند که فراوانی هموزیگوسیته ال 4G (۱۸.۵ درصد) در گروه بیمار بالاتر از گروه کنترل (۲ درصد) می‌باشد (۲۴). در زنان مبتلا به سقط مکرر نیز فراوانی ال 4G بالاتر بوده و هموزیگوسیته ال 5G در گروه بیمار از گروه کنترل پایین‌تر می‌باشد (۲۵). هموزیگوسیته ال 4G می‌تواند با از دست رفتن بارداری در هفته‌های پایین نیز مرتبط باشد. در مطالعه‌ای که روی بیماران مبتلا به سندروم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS (Polycystic Ovarian Syndrome) صورت گرفت، فراوانی ژنوتایپ 4G/4G در گروه بیمار (۴۲/۲۵ درصد)

نسبت به گروه کنترل (۲۴/۲۹ درصد) بالاتر و فراوانی ژنوتایپ 5G/5G در گروه بیمار (۱۴/۰۸ درصد) نسبت به گروه کنترل (۲۸/۰۳ درصد) پایین تر بود (۲۶). منطبق با مطالعه‌ی دیگری، ال 4G می‌تواند زنان مبتلا به celiac را مستعد از دست دادن حاملگی زود هنگام کند. در این مطالعه نیز شیوع ال 4G در گروه بیمار و شیوع ال 5G در گروه کنترل بالا است (۲۷).

در این بررسی، همانطور که گفته شد، در جمعیت زنان ایرانی مبتلا به بارداری خارج رحمی، ال 5G که مرتبط با خونریزی می‌باشد، به عنوان ریسک فاکتور شناخته شد. از عمده مشکلات زنان مبتلا به EP نیز، خونریزی‌های مکرر می‌باشد که گاهی حتی می‌تواند منجر به مرگ مادر شود. بنابراین با توجه به اینکه شیوع ال 5G در زنان مبتلا بالا است، بررسی‌های لازم در زمینه پیش‌آگهی به زنانی که در معرض خطر هستند، ضروری است. می‌توان با دید دیگری نیز این ارتباط را مورد ارزیابی قرار داد و اینگونه بیان کرد که ممکن است ال 5G از طریق مکانیسم دیگری، به جز مکانیسم‌های شناخته شده، در روند ایجاد این بیماری دخیل باشد، مکانیسم اثری که با بیماری‌هایی که با ال 4G در ارتباط می‌باشند، متفاوت است.

بارداری خارج رحمی، به تفکیک قومیتی و نژادی در جوامع مختلف ایرانی مورد بررسی قرار بگیرد. بنابراین، برای اینکه بتوان نتایج دقیق‌تر و محکم‌تری ارائه داد، باید علاوه بر افزایش تعداد نمونه‌ها، عوامل نامبرده را نیز مورد بررسی قرار داد. برای حصول اطمینان و رسیدن به نتایج قابل تعمیم به همه‌ی جمعیت ایرانی پیشنهاد می‌شود بررسی‌های بعدی به تفکیک قومیتی و نژادی انجام شده و اثر عوامل محیطی بررسی شود. تعداد نمونه‌ها افزایش یابد و بیان ژن PAI-1 نیز در بیماری EP بررسی شود. در این بررسی، بین پلی‌مورفیسم 4G/5G PAI-1 با بیماری بارداری خارج رحمی ارتباط معناداری مشاهده شد و آلل 5G به عنوان ریسک فاکتور معرفی گردید.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می‌باشد. بدین وسیله از تمامی پرسنل آزمایشگاه ژنتیک بیمارستان زنان یاس که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، سپاس‌گزاری می‌کنم.

منابع

1. Control CfD, Prevention. Ectopic pregnancy-United States, 1990-1992. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 1995;44(3):46.
2. Marion LL, Meeks GR. Ectopic pregnancy: history, incidence, epidemiology, and risk factors. Clinical obstetrics and gynecology. 2012;55(2):376-86.
3. Asnafi N, Hajjian K, Shahriyari M, Taheri B. [Risk factors in ectopic pregnancy: a case - control study]. J Gorgan Uni Med Sci. 2012; 14(2): 52-57. [Article in Persian].
4. Barnhart KT. Ectopic pregnancy. New England Journal of Medicine. 2009;361(4):379-87.
5. Kirk E, Bottomley C, Bourne T. Diagnosing ectopic pregnancy and current concepts in the management of pregnancy of unknown

نتیجه‌گیری

در بررسی‌های نام برده شده در مورد پلی‌مورفیسم 4G/5G PAI-1، بر خلاف نتایج حاصل از این بررسی، ارتباط ال 5G و هموزیگوسیتی 5G/5G با بیماری‌های ذکر شده وجود نداشت. این عدم تناقض می‌تواند به دلیل کم بودن تعداد نمونه‌ها باشد. از طرفی در این بررسی، صرفاً اثر ژن PAI-1 4G/5G بر بیماری بارداری خارج رحمی بررسی گردیده است. ژن‌های دیگری نیز ممکن است اثر کاهشی یا افزایشی بر این ژن و در نهایت بر این بیماری داشته باشند. هم‌چنین، اثر سن، مصرف دخانیات و دیگر عوامل محیطی نیز در این بررسی قابل چشم‌پوشی نیست. از طرفی بهتر است بررسی اثر این ژن روی

- tube cilia. Human reproduction update. 2006;12(4):363-72.
7. Medicine PCotASfR. Medical treatment of ectopic pregnancy: a committee opinion. Fertility and sterility. 2013;100(3):638-44.
 8. Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly J-L, Fernandez H, Gerbaud L, et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. American Journal of Epidemiology. 2003;157(3):185-94.
 9. Mehta R, Shapiro A. Plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency. Haemophilia. 2008;14(6):1255-60.
 10. Gazi E, Temiz A, Altun B, Barutcu A, Colkesen Y, Silan F, et al. Endothelial function and germ-line ACE I/D, eNOS and PAI-1 gene profiles in patients with coronary slow flow in the Canakkale population: multiple thrombophilic gene profiles in coronary slow flow. Cardiovascular journal of Africa. 2014;25(1):9.
 11. Hoekstra T, Geleijnse JM, Kluft C, Giltay EJ, Kok FJ, Schouten EG. 4G/4G genotype of PAI-1 gene is associated with reduced risk of stroke in elderly. Stroke. 2003;34(12):2822-8.
 12. Gazi E, Temiz A, Altun B, Barutcu A, Silan F, Colkesen Y, et al. Endothelial function and germ-line ACE I/D, eNOS and PAI-1 gene profiles in patients with coronary slow flow in the Canakkale population: multiple thrombophilic gene profiles in coronary slow flow :cardiovascular topic. Cardiovascular journal of Africa. 2014;25(1):9-14.
 13. Madách K, Aladzcity I, Szilágyi Á, Fust G, Gál J, Péntzes I, et al. 4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study. Critical care. 2010;14(2):R79.
 14. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, et al. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G polymorphism and coagulation factor XIII Val34Leu polymorphism: impaired fibrinolysis and early location. Human reproduction update. 2014;20(2):250-61.
 6. Lyons R, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian pregnancy loss. Clinical chemistry. 2003;49(7):1081-6.
 15. Su CK, Yeh KT, Yeh CB, Wang PH, Ho ESC, Chou MC, et al. Genetic polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 is associated with an increased risk of endometrial cancer. Journal of surgical oncology. 2011; 104(7):755-9.
 16. Lee YH, Song GG. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G and the MTHFR 677C/T polymorphisms and susceptibility to polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. 2014;175:8-14.
 17. Jeon YJ, Kim YR, Lee BE, Choi YS, Kim JH, Shin JE, et al. Genetic association of five plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss in Korean women. Thromb Haemost. 2013;110(4):742-50.
 18. GONÇALVES- FILHO RP, Brandes A, Christofolini DM, Lerner TG, Bianco B, Barbosa CP. Plasminogen activator inhibitor- 1 4G/5G polymorphism in infertile women with and without endometriosis. Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica. 2011;90(5):473-7.
 19. Jonasson A, Larsson B, Lecander I, Åstedt B, Larsson J, Hansson SR, et al. Difference in mRNA expression and occurrence of plasminogen activator inhibitors in intrauterine decidua of normal and ectopic human pregnancies. Human Fertility. 1999;2(2):127-32.
 20. Hofmann GE, Glatstein I, Schatz F, Heller D, Deligdisch L. Immunohistochemical localization of urokinase-type plasminogen activator and the plasminogen activator inhibitors 1 and 2 in early human implantation sites. American journal of obstetrics and gynecology. 1994;170(2):671-6.
 21. Bedaiwy MA, Falcone T, Mascha EJ, Casper RF. Genetic polymorphism in the fibrinolytic system and endometriosis. Obstetrics & Gynecology. 2006;108(1):162-8.
 22. Jeddi- Tehrani M, Torabi R, Zarnani AH, Mohammadzadeh A, Arefi S, Zeraati H, et al.

- Analysis of Plasminogen Activator Inhibitor 1, Integrin Beta3, Beta Fibrinogen, and Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms in Iranian Women with Recurrent Pregnancy Loss. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;66(2):149-56.
23. Glueck C, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontaine RN, Moore SK, et al. The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications. *Metabolism*. 2000;49(7):845-52.
24. Aarabi M, Memariani T, Arefi S, Aarabi M, Hantoosh Zadeh S, Akhondi MA, et al. Polymorphisms of plasminogen activator inhibitor-1, angiotensin converting enzyme and coagulation factor XIII genes in patients with recurrent spontaneous abortion. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2011;24(3):545-8.
25. Khosravi F, Zarei S, Ahmadvand N, Akbarzadeh-Pasha Z, Savadi E, Zarnani A-H, et al. Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene mutation and different subgroups of recurrent miscarriage and implantation failure. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2014;31(1):121-4.
26. Sun L, Lv H, Wei W, Zhang D, Guan Y. Angiotensin-converting enzyme D/I and plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphisms are associated with increased risk of spontaneous abortions in polycystic ovarian syndrome. *Journal of endocrinological investigation*. 2010;33(2):77-82.
27. Ciacci C, Tortora R, Scudiero O, Di Fiore R, Salvatore F, Castaldo G. Early pregnancy loss in celiac women: The role of genetic markers of thrombophilia. *Digestive and Liver Disease*. 2009; 41(10):717-20.