



Relationship of 536C/T Tissue Factor Pathway Inhibitor Gene and Alu_I/D Tissue-type Plasminogen Activator Gene Polymorphisms with Recurrent Pregnancy Loss in Iranian Azeri Women

ARTICLE INFO

Article Type

Descriptive Study

Authors

Ameri Z.¹ MSc,
Mehmannavaz Y. * PhD

How to cite this article

Ameri Z, Mehmannaavaz Y. Relationship of 536C/T Tissue Factor Pathway Inhibitor Gene and Alu_I/D Tissue-type Plasminogen Activator Gene Polymorphisms with Recurrent Pregnancy Loss in Iranian Azeri Women. Pathobiology Research. 2018;21(3):147-152.

*Biology Department, Biological Sciences Faculty, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

¹Biology Department, Biological Sciences Faculty, Ahar Branch, Islamic Azad University, Ahar, Iran

Correspondence

Address: Maragheh Branch, Islamic Azad University, Shahid Derakhshi Highway Maragheh, East Azerbaijan Province, Iran

Phone: +98 (41) 37454498

Fax: +98 (41) 37454504

mehman10@iau-maragheh.ac.ir

Article History

Received: January 29, 2018

Accepted: April 16, 2018

ePublished: September 03, 2018

ABSTRACT

Aims Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue plasminogen activator (tPA) deficiency would cause an increase in the viscosity of fibrinogen and low digestion of blood clot, respectively, which are among the dangerous factors responsible for the increase in thrombosis. Although there are reports, indicating the relationship of vein thrombosis and recurrent pregnancy loss (RPL), the effect of polymorphisms connected with thrombosis on the risk of increasing RPL has remained unclear. Thus, the aim of this study was to evaluate the relationship of 536C/T tissue factor pathway inhibitor gene and Alu_I/D tissue-type plasminogen activator gene polymorphisms with recurrent pregnancy loss in Iranian Azeri women.

Instruments & Methods The present case-control study was conducted in Azeri women with RPL and healthy women during 2015-2016. Ninety-five women with RPL were selected by simple random sampling method, and 95 healthy women were selected and assessed, using Multiplex ARMS-PCR method. The data were analyzed by SAS 9.2 software, using logistic regression and Chi-square test.

Findings Among two genes polymorphisms, only tPA polymorphism was significantly related with the increase in RPL, such that allele I in this polymorphism caused more than two-folded odds ratio of RPL compared to allele D. Women between the ages of 25 and 35 years significantly showed the highest odds ratio of RPL.

Conclusion Alu_I/D tissue-type plasminogen activator gene polymorphism is related with an increased risk of RPL in Azeri women in northwestern Iran, but 536C/T tissue factor pathway inhibitor gene does not show such a relationship.

Keywords Abortion Habitual; Thrombosis; Tissue factor pathway inhibitor; Tissue plasminogen activator; Genetic Polymorphism

CITATION LINKS

[1] Genetics of recurrent miscarriage: Challenges, current knowledge, future directions [2] Association of genetic variants in the 3' UTR of HLA-G with Recurrent Pregnancy Loss [3] Obstetrics in family medicine: A practical guide [4] Recurrent pregnancy loss and its relation to FV Leiden, FII G20210A and polymorphisms of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor [5] Thrombophilia and recurrent pregnancy loss: Is heparin still the drug of choice? [6] Hereditary thrombophilia [7] Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss [8] The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor [9] Functional characterization of polymorphisms in the human TFPI gene [10] The TFPI 536C→T mutation is not associated with increased risk for venous or arterial thrombosis [11] Association of genetic polymorphisms with plasma TFPI level: Boon or curse for DVT patients - study from India [12] Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event [13] Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease [14] Structure and function of human tissue-type plasminogen activator (t-PA) [15] Is tissue-plasminogen activator gene polymorphism a risk factor for venous thromboembolism in every population? [16] The role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism [17] The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss [18] Combination of thrombophilic gene polymorphisms as a cause of increased the risk of recurrent pregnancy loss [19] Tissue factor pathway inhibitor: Structure, biology and involvement in disease [20] The relationship between the tissue plasminogen activator Alu I/D polymorphism and venous thromboembolism during pregnancy

ارتباط چندشکلی‌های 536C/T ژن مهارکننده فاکتور مسیر بافتی و Alu I/D ژن فعال‌کننده پلازمینوژن نوع بافتی با سقط مکرر در زنان آذری ایران

زهرا عامری MSc

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد اهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اهر، ایران

یوسف مهمان‌نواز* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

چکیده

اهداف: کمبود مهارکننده مسیر بافتی (TFPI) و فعال‌کننده پلازمینوژن (tPA) به ترتیب باعث افزایش غلظت فیبرینوژن و کاهش هضم لخته خونی می‌شود که عوامل خطر برای پیشرفت ترومبوز هستند. اگر چه ارتباط ترومبوز وریدی با سقط مکرر گزارش شده، اما پیش از این، تاثیر چندشکلی‌های مرتبط با ترومبوز شامل TFPI و tPA روی خطر بروز سقط مکرر نامشخص بوده است، بنابراین هدف این پژوهش بررسی ارتباط چندشکلی‌های 536C/T ژن مهارکننده فاکتور مسیر بافتی و Alu I/D ژن فعال‌کننده پلازمینوژن نوع بافتی با سقط مکرر در زنان آذری ایران بود.

مواد و روش‌ها: پژوهش مورد-شاهدی حاضر در جامعه زنان آذری مبتلا به سقط مکرر و زنان سالم در سال ۹۶-۱۳۹۵ اجرا شد. با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، ۹۵ زن مبتلا به سقط مکرر و ۹۵ زن سالم انتخاب و با استفاده از روش Multiplex ARMS-PCR بررسی شدند. داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.2 از طریق آزمون رگرسیون لجستیک و کای اسکور تحلیل شدند.

یافته‌ها: از دو جایگاه ژنی مورد مطالعه، فقط چندشکلی tPA با افزایش خطر ابتلا به سقط مکرر در جامعه مورد مطالعه، همراهی معنی‌داری نشان داد که آلل I این جایگاه ژنی سبب شانس بیش از دوبرابر برای ابتلا به سقط مکرر بیشتر نسبت به آلل D شد. زنان در محدوده سنی ۲۵ تا ۳۵ سال به‌طور معنی‌داری بیشترین شانس سقط مکرر را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: چندشکلی Alu I/D ژن فعال‌کننده پلازمینوژن نوع بافتی با افزایش خطر سقط مکرر در زنان آذری شمال غرب ایران ارتباط دارد. ولی 536C/T ژن مهارکننده فاکتور مسیر بافتی چنین ارتباطی را نشان نمی‌دهد. **کلیدواژه‌ها:** سقط عادت، ترومبوز، مهارکننده فاکتور مسیر بافتی، فعال‌کننده پلازمینوژن نوع بافتی، پلی‌مورفیسم ژنتیکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۱/۲۲

*نویسنده مسئول: mehman10@iau-maragheh.ac.ir

مقدمه

سقط مکرر (RPL) به‌عنوان سه یا بیش از سه سقط به‌صورت مکرر قبل از هفته بیستم بارداری تعریف می‌شود [1, 2]. سقط مکرر یک بیماری چندعاملی است که می‌تواند تحت تاثیر عوامل متعددی نظیر قرارگرفتن در معرض آگروژن‌ها (مانند دارو، الکل و مواد مخدر)، اختلال‌های آناتومیک رحمی، بیماری‌های مخصوص زنان، بیماری‌های خودایمنی و اختلال‌های اندوکراین کنترل‌نشده (مانند بیماری‌های تیروئید، دیابت ملیتوس و فشار خون)، عفونت (مانند سوزاک و سفلیس)، اختلال‌های هموستاز از جمله ترومبوفیلی ارثی، ناهنجاری‌های ژنتیکی و سن (به‌طور عمده مادر) قرار گیرد. با وجود علل مختلف، هنوز علت ۴۰-۵۰٪ سقط ناشناخته مانده است [2-4]. ترومبوفیلی که به‌عنوان افزایش بیش از حد تمایل به لخته‌شدن خون به‌خصوص در دوران بارداری تعریف می‌شود، یک علت شایع RPL است و در ۴۰-۵۰٪ از موارد RPL مشاهده می‌شود. اگر حاملگی تحت تاثیر ترومبوفیلی قرار گیرد، حالت

انعقادی وخیم‌تر می‌شود و ممکن است جریان خون را در رگ‌های مادر مختل کند و منجر به ترومبوز وریدی و لخته‌شدن خون در عروق خونی جفت شود که به‌نوبه خود منجر به محدودشدن رشد جنین یا مرگ جنین می‌شود [5]. ترومبوفیلی می‌تواند از فاکتورهای ژنتیکی، تغییر در مکانیزم لخته‌شدن یا تعامل بین این دو به وجود آید [6]. تغییرات ژنتیکی و آللی ژن‌های درگیر در التهاب و ترومبوفیلی به‌شکل تجمعی، خطر سقط مکرر را افزایش می‌دهد [1].

مهارکننده فاکتور مسیر بافتی (TFPI) نقش کلیدی را در تنظیم تولید ترومبین ایفا می‌کند [7]. ترومبین، یک سرین‌پروتئاز است که تبدیل فیبرینوژن را به فیبرین که از طریق ساختار داربستی، پلاکت‌ها را در مکان‌های آسیب عروقی تثبیت می‌کند، کاتالیز می‌کند [8]. کنترل تولید ترومبین برای هموستاز طبیعی آن ضروری است و این امر توسط مسیرهای ضدانعقادی انجام می‌شود. شواهد نشان داده است که کاهش سطح پلاسمایی TFPI باعث افزایش غلظت فیبرینوژن می‌شود و یک عامل خطر برای پیشرفت ترومبوز است [8]. ژن TFPI روی کروموزوم ۲ و در ناحیه کروموزومی 2q32.1 قرار گرفته و محدوده ۷۰ کیلوبازی را پوشش می‌دهد و شامل ۱۳ اگزون است که توسط ۱۲ اینترون از هم جدا می‌شوند [9]. چند پلی‌مورفیسم و تغییرات آللی در ژن TFPI گزارش شده که برخی از آنها با سطح کلی TFPI در پلازما مرتبط هستند، اما هنوز هیچ تحقیق جامعی از این تغییرات انجام نشده است [9]. چند پلی‌مورفیسم در پروموتور و ناحیه کدکننده ژن TFPI گزارش شده است و تعدادی از آنها با سطح TFPI در پلازما ارتباط دارند. اخیراً یک پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNP) در اگزون ۷ (536 C/T) که منجر به تغییر اسیدآمینه پرولین به لوسین در موقعیت ۱۵۱ پروتئین می‌شود، کشف شده که ممکن است با ترومبوز و در نتیجه با سقط مکرر ناشی از ترومبوفیلی مرتبط باشد [10]. فراوانی آلل T در جمعیت مدیترانه، ۱۰٪ [10] و در جمعیت هندوستان، صفر گزارش شده است [11].

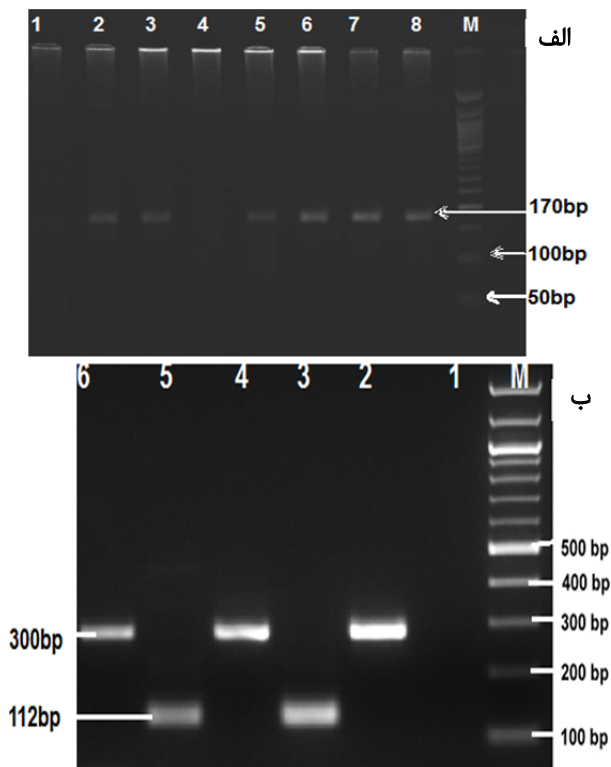
فعال‌کننده بافتی پلازمینوژن (tPA)، یک سرین‌پروتئاز با ۵۲۷ آمینواسید است [12] که در فیبرینولیز، فرآیندی برای هضم لخته خونی، نقش دارد [13]. در حضور فیبرین، پلازمینوژن با شکسته‌شدن پیوند پپتیدی Arg561-Val562 توسط tPA به پلازمین تبدیل می‌شود. پلازمین به‌نوبه خود لخته فیبرین را هضم می‌کند و محصولات تجزیه‌شده فیبرین به‌صورت محلول در می‌آیند. کمبود tPA می‌تواند هضم لخته را کاهش دهد و منجر به بیماری‌های ترومبوآمبولیک شود [6, 14]. ژن tPA انسانی در ناحیه 8p11.21 کروموزوم ۸ انسانی قرار گرفته و توالی کامل آن ۳۳ کیلوباز و مشتمل بر ۱۴ اگزون است که توسط ۱۳ اینترون از هم جدا شده‌اند. یک پلی‌مورفیسم تکرار حذف/درج در ناحیه Alu I/D (Alu I/D) در ژن tPA در اینترون h وجود دارد که با ترومبوفیلی مرتبط گزارش شده است [12, 15]. فراوانی آلل I در جمعیت ترکیه برابر ۴۴/۱٪ [15]، در جمعیت آفریقاییان ایالات متحده برابر ۳۴/۵٪ [16] و در جمعیت ایران برابر ۴۲/۷٪ [17] گزارش شده است.

فراوانی پلی‌مورفیسم‌های ژن TFPI و tPA در جمعیت زنان شمال غرب ایران هنوز مشخص نشده و از طرفی ارتباط این چندشکلی‌ها با سقط مکرر مورد مطالعه قرار نگرفته است. بنابراین، هدف پژوهش حاضر، بررسی ارتباط چندشکلی‌های 536C/T ژن مهارکننده فاکتور مسیر بافتی و Alu I/D ژن فعال‌کننده پلازمینوژن نوع بافتی با سقط مکرر در زنان آذری ایران بود.

چندشکلی‌های ژن مهارکننده فاکتور مسبب بافتی و فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع بافتی و همچنین آزمون کای اسکور برای مقایسه گروه زنان مبتلا به سقط جنین و زنان سالم با همدیگر به صورت جداگانه برای هر کدام از چندشکلی‌های مورد مطالعه صورت گرفت.

جدول ۱) مشخصات آغازگرهای مورد استفاده *tPA* و *TFPI*

توالی	نوع
tPA	
5'CCCTATGAGATTAGAACACTACAT3'	F (حذف اینترون h)
5'TGAGATTAGAACACTACGGC3'	F (درج اینترون h)
5'AGCCTCGGGTTCTTCAGC3'	F (حذف/درج اینترون h)
TFPI	
5'CCACCTGGAAACCATTTCG3'	TFPI (536C). NO. R
5'TCCACCTGGAAACCATTCA3'	TFPI (536T). MU. R
5'GAATGAAATTGCCAGAAGTCTGC3'	TFPI (536). COM.F



شکل ۱) نمونه‌ای از الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تعیین ژنوتیپ *tPA* و *TFPI* الف- در ناحیه 536C/T ژن *TFPI*، ب- در ناحیه ALU I/D ژن *tPA*

یافته‌ها

میانگین سنی گروه زنان دارای سقط مکرر $30/11 \pm 5/79$ ، در محدوده ۱۸-۴۳ سال و گروه کنترل $28/4 \pm 5/77$ در محدوده ۱۸-۳۹ سال بود. میانگین شاخص توده بدنی گروه بیمار نیز برابر $23/11 \pm 5/08$ ، در محدوده $14/6 - 37/70$ کیلوگرم بر متر مربع و گروه کنترل $23/68 \pm 4/62$ در محدوده $14/6 - 35/50$ کیلوگرم بر متر مربع قرار داشت.

ژنوتیپ برای نمونه‌های با ژنوتیپ نرمال، هتروزیگوت و نادر در چندشکلی *TFPI* 536C/T تعیین شد (شکل ۱) و تفاوت معنی‌داری بین دو گروه بیمار و کنترل وجود نداشت ($p=0/832$). فراوانی آلل C و آلل T در بیماران و زنان سالم (گروه کنترل) از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت ($p=0/911$; جدول ۲). با توجه به عدم معنی‌داری تفاوت نسبت شانس سقط مکرر در زنان

پژوهش مورد-شاهدی حاضر در جامعه زنان آذری مبتلا به سقط مکرر و زنان سالم شمال غرب ایران در سال ۹۶-۱۳۹۵ اجرا شد. برای انتخاب گروه اول با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده، ۹۵ نفر از زنان مبتلا به سقط مکرر (سنین ۱۸ تا ۴۳) که به مراکز درمان ناباروری شمال غرب کشور و آزمایشگاه‌های ژنتیک پزشکی مراجعه کرده بودند و بیماری آنها توسط پزشک متخصص زنان تایید شده بود، انتخاب شدند. برای انتخاب زنان سالم نیز با روش نمونه‌گیری تصادفی ساده ۹۵ نفر از بین زنان آذری دارای حداقل دو زایمان سالم همسان‌شده از لحاظ سن و شاخص توده بدنی با گروه بیمار انتخاب شدند. برای تعیین تعداد مناسب نمونه از فرمول کوکران و حجم نمونه ۱۹۰ نفر به دست آمد که ۹۵ مورد بیمار قطعی مبتلا به سقط مکرر در طول تشخیص و ۹۵ فرد سالم به‌عنوان کنترل انتخاب شد. اطلاعات مورد نیاز شامل اطلاعات دموگرافیک (سن، نسبت زوجین، قومیت) هم برای زنان مبتلا و هم برای افراد کنترل تهیه شد. معیارهای ورود به گروه زنان مبتلا به سقط مکرر، داشتن محدوده سنی ۱۸ تا ۴۳ سال، ابتلای قطعی به سقط، حجم توده بدنی (BMI) در دامنه نرمال ($BMI < 25$) $18/5 < BMI < 25$ کیلوگرم بر متر مربع)، تکمیل پرسش‌نامه (سن ابتلا، نوع سقط، وجود یا عدم وجود مشکل کروموزومی در جنین، وجود یا عدم وجود مشکلات ترومبوفیلیک، تعداد سقط، منفی یا مثبت بودن سندروم‌های فسفولیپید و سابقه فامیلی) و رضایت آگاهانه بود. معیارهای خروج نیز شامل ناهمخوانی داده‌های بالینی بیمار و نتایج آزمایشگاهی برای تشخیص قطعی سقط، قرارگرفتن بیمار در خارج از بازه سنی و حجم توده بدنی تعریف‌شده و مشخص‌بودن دلیل سقط (اختلالات کروموزومی، سندرم APS، تروما و اختلالات هورمونی) بود. از معیارهای ورود به گروه زنان سالم، داشتن حداقل دو زایمان سالم، محدوده سنی ۱۸ تا ۴۳ سال و قرارداشتن در دامنه نرمال BMI بود. معیارهای خروج نیز شامل قرارگرفتن مادر در خارج از بازه سنی و حجم توده بدنی تعریف‌شده و وجود سابقه سقط با هر دلیلی در یکی از بارداری‌ها و وجود سقط در سابقه فامیلی بود.

از هر فرد ۵ سی‌سی خون گرفته و در ویال‌های حاوی اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA)، به‌عنوان ماده ضدانعقاد ریخته شد. سپس این نمونه‌ها برای مطالعات بعدی در فریزر در دمای $-20^{\circ}C$ نگهداری شدند. DNA ژنومی به روش نمک اشباع استخراج شد. پلی‌مورفیسم‌های *TFPI* 536C/T و *tPA* Alu I/D به‌وسیله روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندمرحله‌ای به روش سیستم جهش مقاوم به تکثیر (Multiplex ARMs-PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. مراحل PCR برای هر دو پلی‌مورفیسم با ۱۰ دور در $95^{\circ}C$ (۲ دقیقه)، $99^{\circ}C$ (۱۵ ثانیه) و $63^{\circ}C$ (۱ دقیقه) و سپس به‌وسیله ۲۵ دور در $60^{\circ}C$ (۵۰ ثانیه) و $72^{\circ}C$ (۳۰ ثانیه) انجام گرفت. برای پلی‌مورفیسم *TFPI* 536C/T، قطعه ۱۷۰ جفت‌بازی و برای پلی‌مورفیسم *tPA* Alu I/D، قطعه ۳۳۰ جفت‌بازی (پلی‌مورفیسم I) و قطعه ۱۲۰ جفت‌بازی (پلی‌مورفیسم D) با استفاده از پرایمرهای مستقیم و معکوس تکثیر شدند (جدول ۱). محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم‌بروماید و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱) و باندهای DNA توسط دستگاه Documentation Gel مشاهده شد.

داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.2 از طریق مدل رگرسیون لجستیک برای بررسی متغیرهای سن مادر، شاخص توده بدنی به‌صورت گروه‌بندی،

ژنی سبب شانس بیش از دوبرابر برای ابتلا به سقط مکرر بیشتر نسبت به آلل D شد (جدول ۴).

نمای شماتیک نسبت شانس ابتلا به سقط مکرر برای ژنوتیپ‌های مختلف tPA Alu I/D شامل D/D، D/I و I/I به‌منظور تعیین نوع اثر متقابل بین آلل‌ها در این جایگاه ژنی رسم شد (شکل ۲). بیشترین وقوع سقط مکرر در زنان دارای سن ۲۵ تا ۳۵ سال اتفاق افتاده بود، به‌طوری که نسبت شانس وقوع سقط مکرر در این زنان نسبت به زنان بالای ۳۵ سال به میزان ۱/۲۹ برابر (p=۰/۵۰۷) و نسبت به زنان ۲۵ و زیر ۲۵ سال در حدود ۲/۵ برابر بود (p=۰/۰۰۶؛ جداول ۵ و ۶). در هیچ کدام از روش‌های در نظر گرفته شده، اثر شاخص توده بدنی مادران بر سقط مکرر معنی‌دار نبود (جدول ۷).

جدول ۲ توزیع فراوانی مطلق (تعداد) و نسبی (درصد) ژنوتیپی و آلی چندشکلی ژن TFPI در ناحیه 536C/T در زنان گروه بیمار و کنترل و آزمون همراهی آنها با خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان آذری شمال غرب ایران (هر گروه ۹۵ نفر)

ژنوتیپ/آلل	گروه کنترل	گروه بیمار	آماره خیدو	سطح معنی‌داری
C/C	۶۰ (۶۳/۱)	۵۸ (۶۱/۱)	۰/۳۶۷	۰/۸۳۲
C/T	۱۳ (۱۳/۷)	۱۶ (۱۶/۸)		
T/T	۲۲ (۲۳/۲)	۲۱ (۲۲/۱)		
C	۱۳۳ (۷۰/۰)	۱۳۲ (۶۹/۵)	۰/۱۰۲	۰/۹۱۱
T	۵۷ (۳۰/۰)	۵۸ (۳۰/۵)		

جدول ۳ توزیع فراوانی مطلق (تعداد) و نسبی (درصد) ژنوتیپی و آلی چندشکلی ژن tPA در ناحیه Alu I/D در زنان گروه بیمار و کنترل و آزمون همراهی آنها با خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان شمال غرب ایران (هر گروه ۹۵ نفر)

ژنوتیپ/آلل	گروه کنترل	گروه بیمار	آماره خیدو	سطح معنی‌داری
D/D	۷۸ (۸۲/۱)	۶۲ (۶۵/۳)	۷/۶۶۹	۰/۰۲۲
D/I	۷ (۷/۴)	۱۸ (۱۸/۹)		
I/I	۱۰ (۱۰/۵)	۱۵ (۱۵/۸)		
D	۱۶۳ (۸۵/۸)	۱۴۲ (۷۴/۷)	۷/۳۲۶	۰/۰۰۷
I	۲۷ (۱۴/۲)	۴۸ (۲۵/۳)		

جدول ۴ مقایسه دوگانه بین ژنوتیپ‌های مختلف چندشکلی tPA Alu I/D در رابطه با همراهی آنها با سقط مکرر در زنان آذری شمال غرب ایران (هر گروه ۹۵ نفر)

مقایسه دوگانه	نسبت شانس (۹۵٪ فاصله اطمینان)	نسبت خطر (۹۵٪ فاصله اطمینان)	آماره خیدو	سطح معنی‌داری
D/I یا D/D	(۰/۱۲۱۴-۰/۷۸۷۱) ۰/۳۰۹	(۰/۴۵۲۵-۰/۸۳۶۱) ۰/۶۱۵۱	۶/۵۲	۰/۰۱۰۶۷
I/I یا D/D	(۰/۵۰۹۸-۱/۰۶۸۷) ۰/۵۳۰	(۰/۲۲۲۷-۱/۲۶۰۷) ۰/۷۳۸۱	۲/۱	۰/۱۴۷۳
I/I یا D/I	(۰/۵۲۴۵-۵/۶۰۲۸) ۱/۷۱۴	(۰/۸۰۲۲-۱/۷۹۵۱) ۱/۲	۰/۸	۰/۳۷۱۱
I یا D	(۰/۵۹۰۸-۰/۸۹۵۷) ۰/۴۹	(۰/۵۹۰۸-۰/۸۹۵۷) ۰/۷۲۷۵	۷/۳۳	۰/۰۰۷

جدول ۵ مقایسه گروه‌های سنی مختلف زنان مبتلا به سقط مکرر و زنان سالم آذری شمال غرب ایران (هر گروه ۹۵ نفر)

گروه سنی	گروه کنترل	گروه بیمار	آماره خیدو	سطح معنی‌داری
۲۵ و زیر ۲۵ سال	۴۴ (۴۶/۳۲)	۲۶ (۲۷/۳۷)	۷/۶۱۵۴	۰/۰۲۲
بین ۲۵ تا ۳۵ سال	۳۱ (۳۲/۶۳)	۴۶ (۴۸/۴۲)		
بالای ۳۵ سال	۲۰ (۲۱/۰۵)	۲۳ (۲۴/۲۱)		

گروه بیمار و کنترل بین ژنوتیپ‌ها و نیز آلل‌های مختلف این چندشکلی، مقایسات دوگانه و نیز تعیین نوع غلبه احتمالی در این جایگاه ژنی دنبال نشد.

پلی‌مورفیسم ژنتیکی TFPI: در نمونه‌ای از الکتروفورز ژل آگارز مربوط به تعیین ژنوتیپ در ناحیه 536C/T ژن TFPI، چاهک‌های شماره ۱ و ۲ حاوی یک نوع نمونه DNA بودند. در چاهک شماره ۱، پرایمر نرمال با DNA واکنش نداد و باند ایجاد نشد، اما در چاهک شماره ۲، پرایمر موتانت با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، پس فرد دارای ژنوتیپ نادر T/T بود. چاهک‌های شماره ۳ و ۴ حاوی یک نوع نمونه DNA بودند. در چاهک شماره ۳، پرایمر نرمال با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، اما در چاهک شماره ۴، پرایمر موتانت با DNA واکنش نداد و باند ایجاد نشد، پس فرد دارای ژنوتیپ نرمال C/C بود. چاهک‌های شماره ۵ و ۶ حاوی یک نوع نمونه DNA بودند. در چاهک شماره ۵، پرایمر نرمال با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، همچنین در چاهک شماره ۶، پرایمر موتانت با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، پس فرد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت T/C بود. چاهک‌های شماره ۷ و ۸ حاوی یک نوع نمونه DNA بودند. در چاهک شماره ۷، پرایمر نرمال با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، همچنین در چاهک شماره ۸، پرایمر موتانت با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، پس فرد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت T/C بود (شکل ۱-الف).

پلی‌مورفیسم ژنتیکی tPA: در تعیین نمونه‌ای از ژنوتیپ در ناحیه ALU I/D ژن tPA، چاهک‌های شماره ۱ و ۲ حاوی یک نوع نمونه DNA بودند. در چاهک شماره ۱، پرایمر نرمال با DNA واکنش نداد و باند ایجاد نشد. در چاهک شماره ۲، پرایمر موتانت با DNA واکنش داد و قطعه‌ای به اندازه ۳۰۰ جفت‌باز تکثیر و باند ایجاد شد، پس فرد دارای ژنوتیپ نادر I/I بود. چاهک‌های شماره ۳ و ۴ حاوی یک نوع نمونه DNA بودند. در چاهک شماره ۳، پرایمر نرمال با DNA واکنش داد و قطعه‌ای به طول ۱۱۲ جفت‌باز تکثیر و باند ایجاد شد. در چاهک شماره ۴، پرایمر موتانت با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، پس فرد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت I/D بود. چاهک‌های شماره ۵ و ۶ حاوی یک نوع نمونه DNA بودند. در چاهک شماره ۵، پرایمر نرمال با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد. در چاهک شماره ۶، پرایمر موتانت با DNA واکنش داد و باند ایجاد شد، پس فرد دارای ژنوتیپ هتروزیگوت I/D بود (شکل ۱-ب؛ جدول ۲).

بین دو گروه بیمار و کنترل از نظر تاثیر ژنوتیپ‌های چندشکلی tPA در ناحیه Alu I/D بر افزایش خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان آذری شمال غرب ایران تفاوت معنی‌داری وجود داشت (p=۰/۰۲۲؛ جدول ۳). همچنین تفاوت معنی‌داری بین آلل‌های D و I در رابطه با سقط مکرر وجود داشت (p=۰/۰۰۷؛ جدول ۳). نسبت شانس و نسبت خطر سقط مکرر در مادران دارای ژنوتیپ D/D در مقابل ژنوتیپ D/I معنی‌دار بود (p=۰/۰۱۰۶۷؛ جدول ۴)، یعنی نسبت شانس سقط مکرر در ژنوتیپ D/D کمتر از یک سوم ژنوتیپ D/I یا بالعکس و این نسبت در مادران دارای ژنوتیپ D/I بیش از سه‌برابر (۳/۲۳) مادران دارای ژنوتیپ D/D بود. کمترین میزان سقط مکرر در زنان دارای ژنوتیپ D/D اتفاق افتاده بود و بیشترین آن در ژنوتیپ D/I دیده شد، پس احتمال وجود غلبه ماورایی بین آلل‌های این جایگاه ژنی وجود داشت. تفاوت بین ژنوتیپ هتروزیگوت با ژنوتیپ هموزیگوت مغلوب I/I و تفاوت بین ژنوتیپ‌های هموزیگوت معنی‌دار نبود (شکل ۲). آلل I این جایگاه

سقط‌های مکرر دیده می‌شوند، مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعه *گونز/لر-کونجرو* و همکاران در ارتباط با ژنوتیپ TFPI در مدیترانه نشان داده است که جهش TFPI 536C/T در بیماران مبتلا به ترومبوز وریدی هیچ تفاوتی با گروه کنترل ندارد و همچنین نشان داده‌اند که شیوع این ژنوتیپ در جمعیت کلی مدیترانه بیشتر از آلمان بوده است [10]. همچنین مطالعه *کمال* و همکاران نشان داده که پلی‌مورفیسم TFPI 536C/T در جمعیت هند و بین افراد مبتلا به ترومبوز وریدی و کنترل وجود نداشته است [11]. در ارتباط با پلی‌مورفیسم ژن tPA، *هوپر* و همکاران در سال ۲۰۰۰، نقش پلی‌مورفیسم I/D را در افراد بالغ آمریکایی-آفریقایی مبتلا به ترومبوز بررسی کرده و گزارش کرده‌اند که ارتباط معنی‌داری بین آلل D و ترومبوز عروقی در این جمعیت وجود دارد و یک افزایش نسبت شانس ابتلا به ترومبوز عروقی با افزایش تعداد آلل‌های D وجود دارد [16]. همچنین مطالعاتی که توسط *هوپر* و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام شده، نشان داده است که هیچ ارتباطی بین ترومبوز طی بارداری و پلی‌مورفیسم tPA Alu I/D وجود ندارد. در این مطالعه، نسبت شانس ترومبوز برای ژنوتیپ I/I و I/D در زنان سفیدپوست به‌طور معنی‌داری بالاتر از ژنوتیپ D/D به دست آمده است [20]. *اوزوگولگن* و همکاران هیچ ارتباطی بین ژنوتیپ tPA Alu I/D و ترومبوفیلی عروقی در جمعیت یافت نکرده‌اند و تفاوت ژنوتیپ‌های tPA در این مطالعه روی شدت بیماری اثرگذار نبود، اما مشخص کرده‌اند که فرکانس این ژنوتیپ در گروه کنترل و بیمار از موارد گزارش شده از غرب جهان متفاوت است [15]. از جمله مطالعات دیگر، مطالعه *زنوزی* و همکاران در سال ۲۰۱۳ بوده است که هیچ ارتباطی بین ژنوتیپ tPA Alu I/D و سقط مکرر مشاهده نکردند [17].

نتیجه مطالعه حاضر نشان داد که بین پلی‌مورفیسم ژنتیکی ژن TFPI 536C/T و سقط مکرر، ارتباط آماری معنی‌داری وجود داشت و با توجه به اینکه بین این چندشکلی با ترومبوفیلی در مطالعات گذشته ارتباط معنی‌داری گزارش نشده است، شاید بتوان گفت که عدم معنی‌داری مشاهده‌شده در این تحقیق با سقط مکرر می‌تواند با عدم معنی‌داری این چندشکلی با ترومبوفیلی گزارش شده در تحقیقات قبلی توجیه شود. براساس یافته‌ها در این مطالعه ارتباط بین پلی‌مورفیسم ژنتیکی ژن tPA I/D و سقط مکرر، معنی‌دار بود. نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات قبلی در رابطه با همراهی چندشکلی ژن tPA I/D با ترومبوز مغایرت داشت. در این تحقیق زنان دارای محدوده سنی ۲۵ تا ۳۵ سال به‌طور معنی‌داری بیشترین شانس سقط مکرر را نسبت به زنان دارای سن پایین‌تر از ۲۵ و بالاتر از ۳۵ سال نشان دادند. در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پلی‌مورفیسم tPA Alu I/D با سقط مکرر در جمعیت مورد مطالعه مرتبط بود.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به رغبت اندک مراکز درمان ناباروری برای اجازه دسترسی محققان دانشگاهی به اطلاعات و نمونه‌های خون مورد نیاز برای انجام تحقیقات ژنتیک و نیز رغبت پایین افراد مورد مطالعه در تکمیل پرسش‌نامه اشاره نمود که باعث شد تا امکان مطالعه روی متغیرهای دیگر نظیر جنسیت و محل لانه‌گزینی جنین در این تحقیق فراهم نشود. با توجه به این که بیماری سقط مکرر، یک بیماری چندعاملی است، لذا پیشنهاد می‌شود به‌منظور تعیین نقش این دو پلی‌مورفیسم در این بیماری، مطالعات در جمعیت بزرگ‌تر، قومیت‌ها و جمعیت‌های دیگر و همچنین تاثیر سایر عوامل دخیل در آن نیز

جدول ۶) مقایسه ارتباط سن زنان مبتلا به سقط جنین از نظر خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان آذری شمال غرب ایران

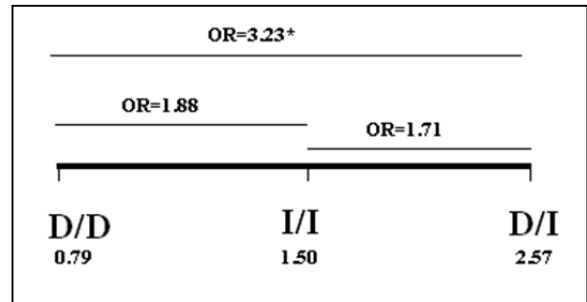
گروه سنی	نسبت شانس (OR)	فاصله اطمینان ۹۵% (CI)	آماره خرد	سطح معنی‌داری
۲ یا ۱	۰/۳۹۸۲	۰/۲۰۴۸-۰/۷۷۴۵	۷/۴۹	۰/۰۰۶
۳ یا ۱	۰/۵۱۳۸	۰/۲۳۷۷-۱/۱۱۰۷	۲/۹	۰/۰۸۸
۳ یا ۲	۱/۲۹۰۳	۰/۶۰۷۹-۲/۷۳۹	۰/۴۴	۰/۵۰۷

گروه سنی ۱: ۲۵ و کمتر از ۲۵ سال، گروه سنی ۲: بین ۲۵ تا ۳۵ سال و گروه سنی ۳: بالای ۳۵ سال هستند

جدول ۷) بررسی ارتباط شاخص توده بدنی مادر به دو صورت متغیر کمی و گروه‌بندی شده با خطر ابتلا به سقط مکرر در زنان آذری شمال غرب ایران

پارامتر	نسبت شانس (OR)	فاصله اطمینان ۹۵% (CI)	آماره خرد	سطح معنی‌داری
BMI به صورت متغیر کمی	۰/۹۷۵	۰/۹۱۹-۱/۰۳۵	۰/۶۷۸۱	۰/۴۱۰۲
BMI به صورت گروه‌بندی شده	-	-	۱/۵۵۴۱	۰/۶۶۹۸

برای گروه‌بندی این متغیر براساس استاندارد سازمان بهداشت جهانی، چهار گروه شامل گروه ۱: زنان لاغر ($BMI \leq 18.5$)، گروه ۲: زنان دارای وزن نرمال ($18.5 < BMI < 25$)، گروه ۳: زنان دارای اضافه‌وزن ($25 \leq BMI < 30$) و گروه ۴: زنان چاق ($BMI \geq 30$) در نظر گرفته شد



شکل ۲) نمای شماتیک نسبت شانس ابتلا به سقط مکرر برای ژنوتیپ‌های مختلف tPA Alu I/D

اعداد زیر هر ژنوتیپ نشان‌دهنده نسبت انفرادی هر ژنوتیپ است. اعداد روی خطوط، نسبت شانس مشترک سقط مکرر را در ژنوتیپ انتهایی راست خط نسبت به ژنوتیپ انتهایی چپ خط نشان می‌دهد و علامت * به مفهوم معنی‌دار بودن نسبت شانس در مقایسه دو به دو است

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی ارتباط چندشکلی‌های TFPI 536C/T ژن مهارکننده فاکتور مسير بافتی و tPA Alu I/D ژن فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع بافتی با سقط مکرر در زنان آذری ایران انجام شد. یکی از عوامل ژنتیکی موثر بر سقط مکرر، تغییرات آللی یا پلی‌مورفیسم‌های تک‌نوکلئوتیدی ژن‌های ترومبوفیلیک است [18]. حاملگی یک وضعیت مرتبط با ترومبوفیلی است و بنابراین با افزایش چند فاکتور دخیل در لخته‌سازی همراه است. زنان دارای فاکتورهای خطر ترومبوتیک مانند ترومبوفیلی ارثی، سقط جنین را طی بارداری نشان داده‌اند [11]. TFPI نقش مهمی در تنظیم مسیر انعقادی از طریق مهار کمپلکس FVIIa/TF و Xa داشته [7, 8, 19] و tPA نیز دارای نقش اساسی در تبدیل پلاسمینوژن به پلاسمین و تخریب فیبرین است [6, 12, 13]. بنابراین کمبود این دو عامل یکی از عوامل پیشرفت ترومبوفیلی است [6, 9, 12, 13]. با این حال، نقش چندشکلی‌های این ژن‌ها در سقط مکرر به‌طور مستقیم مورد مطالعه قرار نگرفته و هنوز ناشناخته است و عمدتاً ارتباط این ژن‌ها با ترومبوفیلی و ترومبوز وریدی که همراه ۴۰ تا ۵۰%

Thromb Haemost. 2012;108(4):693-700.

8- Crawley JT, Lane DA. The haemostatic role of tissue factor pathway inhibitor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(2):233-42.

9- Skretting G, Stavik B, Landvik NE, Myklebust CF, Iversen N, Zienolddiny S, et al. Functional characterization of polymorphisms in the human TFPI gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397(1):106-11.

10- González-Conejero R, Lozano ML, Corral J, Martínez C, Vicente V. The TFPI 536C→T mutation is not associated with increased risk for venous or arterial thrombosis. *Thromb Haemost.* 2000;83(5):787-8.

11- Kamal K, Amit S, Kanwaljeet S, Ravi R, Hareram P, Ravi K, et al. Association of genetic polymorphisms with plasma TFPI level: Boon or curse for DVT patients - study from India. *Blood Cells Mol Dis.* 2017;66:31-6.

12- Ludwig M, Wohn KD, Schleuning WD, Olek K. Allelic dimorphism in the human tissue-type plasminogen activator (TPA) gene as a result of an Alu insertion/deletion event. *Hum Genet.* 1992;88(4):388-92.

13- Brandt JT. Plasminogen and tissue-type plasminogen activator deficiency as risk factors for thromboembolic disease. *Arch Pathol Lab Med.* 2002;126(11):1376-81.

14- Van Zonneveld AJ, Veerman H, Macdonald ME, Van Mourik JA, Pannekoek H. Structure and function of human tissue-type plasminogen activator (t-PA). *J Cell Biochem.* 1986;32(3):169-78.

15- Oguzulgen IK, Ekim N, Erkeköl FO, Altinok B, Akar N. Is tissue-plasminogen activator gene polymorphism a risk factor for venous thromboembolism in every population? *J Thromb Thrombolysis.* 2005;19(1):61-3.

16- Hooper WC, Lally C, Austin H, Renshaw M, Dilley A, Wenger NK, et al. The role of the t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphisms in African-American adults with a diagnosis of myocardial infarction or venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2000;99(3):223-30.

17- Poursadegh Zonouzi A, Chaparzadeh N, Ghorbian S, Sadaghiani MM, Farzadi L, Ghasemzadeh A, et al. The association between thrombophilic gene mutations and recurrent pregnancy loss. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(10):1353-9.

18- Torabi R, Zarei S, Zeraati H, Zarnani AH, Akhondi MM, Hadavi R, et al. Combination of thrombophilic gene polymorphisms as a cause of increased risk of recurrent pregnancy loss. *J Reprod Infertil.* 2012;13(2):89-94.

19- Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: Structure, biology and involvement in disease. *J Pathol.* 2006;208(3):327-39.

20- Hooper WC, El-Jamil M, Dilley A, Philipp C, Ellingsen D, Phillips D, et al. The relationship between the tissue plasminogen activator Alu I/D polymorphism and venous thromboembolism during pregnancy. *Thromb Res.* 2001;102(1):33-7.

نتیجه‌گیری

چندشکلی Alu I/D ژن فعال‌کننده پلازمینوژن نوع بافتی با افزایش خطر سقط مکرر در زنان آذری شمال غرب ایران ارتباط دارد، ولی 536C/T ژن مهارکننده فاکتور مسیر بافتی چنین ارتباطی را نشان نمی‌دهد.

تشکر و قدردانی: این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر بوده است. نویسندگان از حمایت‌های مسئولان این واحد دانشگاهی در انجام تحقیق قدردانی می‌نمایند.

تأییدیه اخلاقی: این پژوهش با کد ۲۲۰۳۰۵۰۳۹۵۲۰۰۲ در شورای پژوهشی و کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر به تأیید رسیده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: زهرا عامری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناسی/پژوهشگر اصلی (۵۰٪)؛ یوسف مهمان‌نواز (نویسنده دوم)، روش‌شناسی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: بخشی از منابع توسط این واحد دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر و بقیه توسط نویسنده اول تأمین شده است.

منابع

- 1- Rull K, Nagirnaja L, Laan M. Genetics of recurrent miscarriage: Challenges, current knowledge, future directions. *Front Genet.* 2012;3:34.
- 2- Amodio G, Canti V, Maggio L, Rosa S, Castiglioni MT, Rovere-Querini P, et al. Association of genetic variants in the 3' UTR of HLA-G with Recurrent Pregnancy Loss. *Hum Immunol.* 2016;77(10):886-91.
- 3- Lyons P. Obstetrics in family medicine: A practical guide. 2nd Edition. New York City: Humana Press; 2015. pp. 91-4.
- 4- 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.
- 5- Abu-Heija A. Thrombophilia and recurrent pregnancy loss: Is heparin still the drug of choice?. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2014;14(1):e26-36.
- 6- Khan S, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thromb J.* 2006;4:15.
- 7- Guerra-Shinohara EM, Bertinato JF, Tosin Bueno C, Cordeiro Da Silva K, Burlacchini De Carvalho MH, Pulcineli Vieira Francisco R, et al. Polymorphisms in antithrombin and in tissue factor pathway inhibitor genes are associated with recurrent pregnancy loss.