Archive of SID

مطالعه همراهی پلی‌مورفیسم‌های rs2249863 و rs1233334 بالادست ژن HLA-G با سقط مکرر در جمعیت زنان شمال غرب ایران در بازه زمانی ۱۳۹۷ الی ۱۳۹۸

لیلی خاصوانی[۱]، دکتر محمد خلج کندری[۲*]، بهارک ابراهیمی بهنام[۳]

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲. دانشیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
۳. کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۰/۱۰

خلاصه

مقدمه: از جمله دلایل احتمالی برای سقط‌های مکرر با علت نامشخص، وجود پلی‌مورفیسم‌های ژنی می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی و همراهی پلی‌مورفیسم‌های rs1233334 و rs2249863 بالادست ژن HLA-G با سقط مکرر خودبه‌خودی در جمعیت زنان شمال غرب ایران انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد- شاهدی در سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ بر روی ۱۶۰ نفر از زنان مراجعه‌کننده از منطقه شمال غرب ایران به مرکز ناباروری مادر واقع در شهر تبریز انجام گرفت. ۸۰ نفر از آنها با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی (حداقل ۲ سقط) به عنوان گروه آزمایش و ۸۰ نفر دیگر دارای حداقل یک فرزند و بدون سابقه سقط به‌عنوان گروه کنترل بودند. پس از تهیه نمونه خون محیطی از آنها، DNA ژنومی استخراج و پلی‌مورفیسم‌های مذکور به کمک PCR و تکنیک Sequencing بررسی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) و آزمون فیشر انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فراوانی‌های آلل G و ژنوتیپ GG جایگاه پلی‌مورفیسم rs2249863 بین دو گروه بیمار و کنترل تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$). در مورد جایگاه پلی‌مورفیسم rs1233334، فراوانی‌های آلل C و ژنوتیپ CC هرچند بین دو گروه بیمار و کنترل متفاوت بودند، اما این تفاوت‌ها از نظر آماری معنی‌دار نبودند ($p>۰/۰۵$). همچنین بررسی هاپلوتایپی دو جایگاه، شایع‌ترین هاپلوتایپ را هاپلوتایپ CG مشخص کرد که فراوانی آن بین گروه‌های بیمار و کنترل از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: پلی‌مورفیسم rs2249863 و هاپلوتایپ CG جایگاه‌های rs2249863 و rs1233334 با اختلال سقط مکرر خودبه‌خودی در جمعیت مورد مطالعه همراهی نشان می‌دهند و می‌توان آنها را به‌عنوان فاکتور خطر بالقوه در نظر گرفت.

کلمات کلیدی: پلی‌مورفیسم rs2249863 و rs1233334، سقط مکرر خودبه‌خودی، HLA-G

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر محمد خلج کندری؛ دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. **تلفن:** ۳۳۳۹۲۶۷۴-۰۴۱؛ **پست الکترونیک:** khalaj@tabrizu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

وقوع دو سقط یا بیشتر قبل از هفته ۲۰ بارداری را سقط مکرر خودبه‌خودی (RSA)[1] می‌گویند (۱). عوامل متعددی مانند ناهنجاری‌های کروموزومی، جفتی، ژنتیک، آناتومیک، اندوکرینولوژی، عفونت، عوامل محیطی و ایمونولوژیک را در ایجاد این عارضه دخیل می‌دانند که در ۶۹٪ موارد علت آن ناشناخته گزارش می‌شود (۲). در این میان فاکتورهای خودایمنی (اتوایمیون) و آلوایمیون نقش مهمی را ایفا می‌کنند (۳). مدت‌ها دانشمندان به این مسئله فکر می‌کردند که چرا با وجود اینکه جنین به‌عنوان یک موجود نیمه آلوژن در بدن مادر هست، سلول‌های سیستم ایمنی مادر به آن پاسخ نمی‌دهد؟ تا اینکه آنها اولین بار در سال ۱۹۸۶ بیان مولکول HLA-G را در سلول‌های تروفوبلاستیک جنین گزارش کردند (۴). HLA-G جزء مجموعه سازگاری بافتی (MHC)[2] غیرکلاسیک کلاس یک (Ib) می‌باشد. پلی‌مورفیسم این ژن نسبت به نوع کلاسیک (Ia) کمتر می‌باشد. این مولکول در موقعیت کروموزومی ۳، ۶P۲۱ انسان قرار دارد. دارای ۸ اگزون و ۷ اینترون می‌باشد و تقریباً 4kb طول دارد. پروتئین این ژن ۷ ایزوفرم دارد که ناشی از پیرایش متناوب رونوشت mRNA اولیه می‌باشد که ۴ تای آنها متصل به غشاء (G1، G2، G3، G4) و ۳ تا ترشحی (G5، G6، G7) هستند (۵).

این مولکول باعث تحمل سیستم ایمنی مادر به جنین می‌شود (۶). تحقیقات به‌عمل آمده نشان داده‌اند که مولکول‌های HLA-G در رویان، هنگام لانه‌گزینی به‌صورت اولیه بیان می‌شود که علاوه بر نقش فوق، باعث تکامل تروفوبلاست‌ها شده و نیز باعث اتصال بلاستوسیت‌ها به آندومتر می‌شود (۷). این مولکول نقش مهمی در حفاظت جنین در مقابل حملات سیستم ایمنی مادر دارد. این حملات از طرف سلول‌های کشنده طبیعی (NK[3] Cell) و لنفوسیت‌های کشنده سلول (T cytotoxic) انجام می‌گیرد که توسط HLA-G مهار می‌شود. HLA-G با اتصال به گیرنده‌های اختصاصی خود در سطح انواع سلول‌های ایمنی، باعث غیرفعال کردن آن سلول‌ها و در نتیجه تحمل و بی‌پاسخی می‌شود (۸). در واقع HLA-G لیگاند چندین گیرنده مهاری شامل KIR2DL4[4] (CD158d)، ILT2[5] یا CD 85J یا LIRB1[6] و ILT4 یا CD85d یا IRB2 L IRB2 می‌باشد (۹). سطح HLA-G در دوران بارداری، در خون محیطی مادر تغییر می‌کند. در سه ماهه اول افزایش یافته و در اوایل سه ماهه سوم به حداکثر میزان خود می‌رسد و با نزدیک شدن به زمان زایمان، میزان آن کاهش می‌یابد. کاهش سطح HLA-G طی هفته‌های اول بارداری با عوارضی همچون شکست لانه‌گزینی، سقط‌های مکرر خودبه‌خودی و پره‌اکلامپسی ارتباط دارد (۱۰).

پلی‌مورفیسم‌های HLA-G خصوصاً در 5'-URR[7] و 3'-UTR[8] ژن، می‌تواند بیان رونوشت یا پروتئین HLA-G را تحت تأثیر قرار دهد (۱۱). از جمله پلی‌مورفیسم‌های واقع در ناحیه تنظیمی بالادست ژن HLA-G (5'-URR)، پلی‌مورفیسم‌های rs1233334 در موقعیت (۷۲۵-) و پلی‌مورفیسم rs2249863 در موقعیت (۷۱۶-) می‌باشند (۱۲). برخی گزارشات حاکی از ارتباط این پلی‌مورفیسم‌ها با سقط مکرر خودبه‌خودی است (۱۳، ۱۴).

نظر به اهمیت HLA-G و تأثیر پلی‌مورفیسم‌های آن در موفقیت بارداری و با توجه به اینکه جمعیت‌های مختلف، پیش‌زمینه ژنتیکی متفاوتی دارند و پلی‌مورفیسم‌های rs1233334 و rs2249866 بالادست ژن HLA-G در جمعیت ایران مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم‌های مذکور و همراهی آنها با سقط مکرر خودبه‌خودی (RSA) در جمعیت زنان شمال غرب ایران انجام گرفت.

[1] Recurrent Spontaneous Abortion
[2] Major Histocompatability complex
[3] Natural Killer
[4] Killer immunoglobulin-like
[5] Ig-like transcript
[6] Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member
[7] Upstream regulatory region
[8] Untranslated region

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌کار

این مطالعه مورد- شاهدی در سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ بر روی ۱۶۰ نفر از زنان مراجعه‌کننده از منطقه شمال غرب ایران به مرکز ناباروری مادر واقع در شهر تبریز انجام گرفت. از افراد داوطلب شرکت در این مطالعه رضایت‌نامه آگاهانه اخذ شد و اطلاعات آنها ثبت گردید. این مطالعه به تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تبریز با کد IR.TABRIZU.REC.1398.029 رسید. در این مطالعه ۸۰ زن با سابقه سقط مکرر خودبه‌خودی (حداقل ۲ سقط) که هیچ علت آناتومیکی و هورمونی برای علت سقط آنها شناخته نشده بود و بیماری دیگری نداشتند، به‌عنوان گروه بیمار و ۸۰ زن دیگر بدون سابقه سقط به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. افراد دو گروه از نظر سن و نداشتن بیماری‌های زمینه‌ای با هم جور شده بودند. ۴ سی‌سی نمونه خون محیطی از ۸۰ بیمار با دامنه سنی ۴۵-۲۰ سال و ۸۰ فرد کنترل با دامنه سنی ۴۳-۲۳ سال دریافت شد. نمونه‌های خون در لوله‌های استریل حاوی EDTA در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز:

جهت استخراج DNA از روش نمکی میلر استفاده گردید (۱۵). کیفیت و کمیت DNAهای استخراجی توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفوتومتری تعیین گردید. نمونه‌های DNA به‌دست آمده با استفاده از تکنیک PCR تکثیر یافتند. واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA (۵۰۰ نانوگرم)، ۰/۴ میکرولیتر Taq polymerase (۵ واحد بر میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۸ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۰/۸ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت (۱۰ میکرو مولار)، ۱/۴ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مولار) و ۳۰/۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام گرفت. توالی پرایمرهای رفت و برگشت عبارتند از:

Forward: 5' -GACTCACACGGAAACTTAGG 3'

Reverse: 5' -CACCAGGTTAGGAGAAGGAG 3'

طراحی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار OLIGO7 صورت گرفت و اختصاصیت آنها توسط Primer-BLAST بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت Metabion آلمان ساخته شدند. فرآیند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل: دناتوراسیون اولیه ۱ سیکل ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه، ۳۰ ثانیه اتصال در ۵۸ درجه، ۳۰ ثانیه تکثیر در ۷۲ درجه و ۵ دقیقه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. جهت تأیید درستی PCR، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند و سپس ژل‌ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند.

توالی‌یابی و تعیین ژنوتیپ:

پس از تأیید اختصاصیت و مشاهده تک‌باند اختصاصی در همه نمونه‌ها، محصولات PCR به‌همراه پرایمرهای مربوطه برای توالی‌یابی به شرکت Microsynth در کشور سوئیس ارسال گردید. نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزار Chromas مشاهده و ژنوتیپ افراد از روی آن تعیین شد.

فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه توسط نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۲) محاسبه شدند. جهت مقایسه فراوانی‌ها در بین دو گروه از آزمون فیشر، برای برآورد ارتباط آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها با بیماری از مقدار odd's ratio (نسبت شانس) و جهت بررسی هاپلوتایپی پلی‌مورفیسم‌ها از نرم‌افزار SNP analyzer استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.

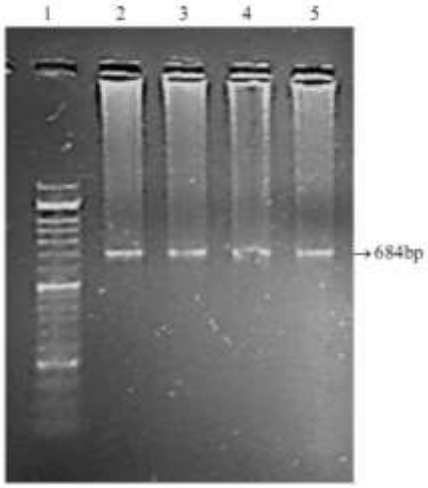
یافته‌ها

تکثیر و تعیین توالی محصولات PCR

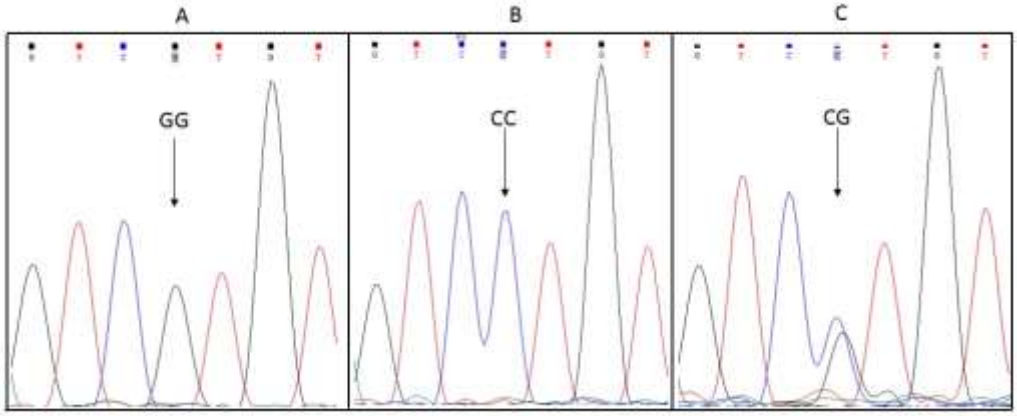
پس از استخراج DNA، قطعه‌ای به طول ۶۸۴ جفت باز توسط PCR تکثیر و اختصاصیت تکثیر توسط الکتروفورز ژل آگاروز تأیید شد. شکل ۱ نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR را نشان می‌دهد. سپس محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شدند. نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزار Chromas قراءت و ژنوتیپ افراد تعیین شدند. شکل‌های ۲ و ۳ نمونه‌ای از کروموگرام‌های ژنوتیپ‌های مختلف در دو جایگاه پلی‌مورفیسم را نشان می‌دهند.

www.SID.ir

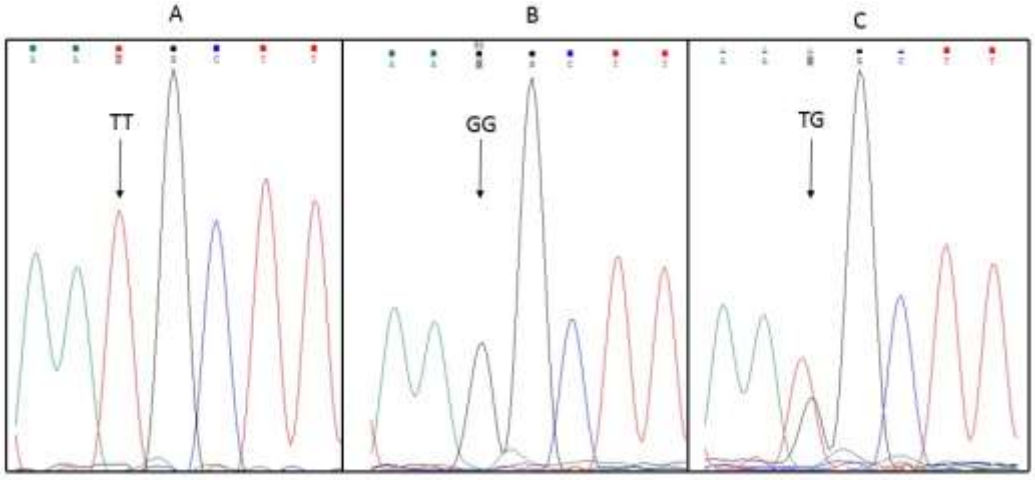
Archive of SID



شکل ۱- الکتروفورز محصولات PCR. تک‌باندها در منطقه ۶۸۴ جفت بازی تشکیل شدند، ستون اول مارکر مولکولی MWD50 و ستون‌های بعدی محصولات PCR را نشان می‌دهد.



شکل ۲- نمونه‌ای از کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی جایگاه ۷۲۵- . A) توالی هموزیگوت GG، B) توالی هموزیگوت CC و C) توالی هتروزیگوت CG را نشان می‌دهد.



شکل ۳- نمونه‌ای از کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی جایگاه ۷۱۶- . A) توالی هموزیگوت TT، B) توالی هموزیگوت GG و C) توالی هتروزیگوت TG را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

Archive of SID

توزیع فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی

توزیع ژنوتیپ‌ها و آلل‌های مختلف جایگاه‌های ۷۲۵- و ۷۱۶- بالادست ژن HLA-G در گروه‌های بیمار و کنترل در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. در مورد پلی‌مورفیسم rs2249863 همانطور که جدول ۱ نشان می‌دهد، اختلاف معناداری بین فراوانی‌های ژنوتیپ‌های TT و GG بین دو گروه وجود داشت (p<۰/۰۵)، اما برای ژنوتیپ GT، تفاوت آماری معناداری بین دو گروه مشاهده نشد (p>۰/۰۵). مقدار odd's ratio به‌دست آمده برای ژنوتیپ GG بزرگ‌تر از ۱ بود (OR=۱/۹۷۱ ،CI:۱/۱۱۳-۳/۵۰۶) که بیانگر آن است که این ژنوتیپ می‌تواند احتمال ابتلاء به سقط مکرر را در این جمعیت افزایش دهد. همچنین مقایسه فراوانی‌های آللی آلل‌های G و T حاکی از اختلاف آماری معنادار در بین گروه بیمار و کنترل بود (p<۰/۰۵) و برای آلل G مقدار بزرگ‌تر از ۱ به‌دست آمد (۳/۷۴۰-CI: ۱/۵۰۹ ،OR=۱/۹۸۳) که بیانگر این است که این آلل می‌تواند باعث افزایش احتمال ابتلاء به سقط مکرر در این جمعیت شود.

در مورد پلی‌مورفیسم rs1233334 در مقایسه فراوانی‌های ژنوتیپی و همچنین فراوانی‌های آللی بین دو گروه بیمار و کنترل، اختلاف آماری معناداری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). با این وجود، مقدار odd's ratio به‌دست آمده برای ژنوتیپ CC (CI: ۰/۸۳۳-۲/۹۵۸، OR=۱/۵۶۸) و آلل C (CI: ۰/۷۲۳-۳/۰۹۲، OR=۱/۴۹) بیشتر از ۱ بود که می‌تواند حاکی از تأثیر مثبت آنها در افزایش احتمال ابتلاء به سقط مکرر باشد.

جدول ۱- توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم rs2249863 (۷۱۶-) ژن HLA-G در گروه‌های بیمار و کنترل

ژنوتیپ/آلل	بیمار (n=۸۰)	کنترل (n=۸۰)	Odd's ratio	سطح معنی‌داری	CI (٪۹۵)
TT	(۵) ۴	(۲۰) ۱۶	۰/۲۱۱	۰/۰۰۱	۰/۰۷۶-۰/۵۸۶
TG	(۴۶/۲۵) ۳۷	(۴۷/۵) ۳۸	۰/۹۵۱	۰/۴۵۸	۰/۵۴۶-۱/۶۵۷
GG	(۴۸/۷۵) ۳۹	(۳۲/۵) ۲۶	۱/۹۷۱	۰/۰۱۲	۱/۱۱۳-۳/۵۰۶
T	(۲۸/۱۲۵) ۴۵	(۴۳/۷۵) ۷۰	۰/۵۰۳	۰/۰۱۴	۰/۲۶۷-۰/۹۴۴
G	(۷۱/۸۷۵) ۱۱۵	(۵۶/۲۵) ۹۰	۱/۹۸۳	۰/۰۱۳	۱/۰۵۹-۳/۷۴۰

جدول۲- توزیع ژنوتیپی و آللی پلی‌مورفیسم rs1233334 (۷۲۵-) ژن HLA-G در گروه‌های بیمار و کنترل

ژنوتیپ/آلل	بیمار (n=۸۰)	کنترل (n=۸۰)	Odd's ratio	سطح معنی‌داری	CI (٪۹۵)
GG	(۸/۷۵) ۷	(۱۲/۵) ۱۰	۰/۶۷۱	۰/۱	۰/۲۴۵-۱/۸۱۲
GC	(۲۰) ۱۶	(۲۶/۲۵) ۲۱	۰/۷۰۲	۰/۱۸	۰/۳۴۴-۱/۴۳۲
CC	(۷۱/۲۵) ۵۷	(۶۱/۲۵) ۴۹	۱/۵۶۸	۰/۰۷	۰/۸۳۳-۲/۹۵۸
G	(۱۸/۷۵) ۳۰	(۲۵/۶۲) ۴۱	۰/۶۷	۰/۱	۰/۳۲۳-۱/۳۸۳
C	(۸۱/۲۵) ۱۳۰	(۷۴/۳۸) ۱۱۹	۱/۴۹	۰/۱	۰/۷۲۳-۳/۰۹۲

توزیع هاپلوتایپی دو پلی‌مورفیسم

بعد از دادن ژنوتیپ افراد بیمار و کنترل به نرم‌افزار SNP Analyzer، ۴ هاپلوتایپ به‌عنوان نتایج نمایان گردید که در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. از میان ۴ هاپلوتایپ مذکور، هاپلوتایپ H1 با توالی CG و فراوانی ۵۷/۳۹٪، شایع‌ترین هاپلوتایپ بود.

جدول ۳- هاپلوتایپ‌های پلی‌مورفیسم‌های rs1233334 و rs2249863 و ارتباط آنها با سقط مکرر

هاپلوتایپ	فراوانی هاپلوتایپ	توالی	سطح معنی‌داری	OR	CI
H_1	۵۷/۳۹	CG	۰/۰۰۹	۱/۸۱۶	۱/۱۵۸-۲/۸۴۸
H_2	۲۰/۱	CT	۰/۱	۰/۶۳۸	۰/۳۶۲-۱/۱۲۳
H_3	۱۵/۸۲	GT	۰/۰۳	۰/۵۲۹	۰/۲۹-۰/۹۶۷
H_4	۶/۶۷	GG	۰/۶	۱/۲۶۷	۰/۴۸۷-۳/۲۹۷

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

سقط مکرر خودبه‌خودی، یکی از شایع‌ترین عوارض بارداری است (۱۶). از شایع‌ترین دلایل سقط‌های مکرر، علل ایمونولوژیک و به‌ویژه تغییرات سطوح HLA-G می‌باشند. مطالعه هانت و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که HLA-G محلول در تمام مراحل حاملگی در خون مادر وجود دارد و مقدار آن با پیشرفت حاملگی افزایش می‌یابد (۱۷). نشان داده شده است که وقوع تغییرات نوکلئوتیدی در توالی‌های پروموتری و 3'-UTR این ژن می‌توانند سطوح HLA-G را با تغییر توالی‌های محل اتصال فاکتورهای رونویسی و یا پس از رونویسی تحت تأثیر قرار دهند (۱۸). در این راستا مطالعه مورئو و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که پلی‌مورفیسم نواحی پروموتری و 3'- UTR بر میزان بیان مولکول HLA-G مؤثر است (۹).

در مطالعه حاضر همراهی پلی‌مورفیسم‌های rs1233334 و rs2249863 بالادست ژن HLA-G با سقط مکرر در جمعیت زنان شمال غرب ایران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی پلی‌مورفیسم rs2249863 نشان داد که فراوانی ژنوتیپ GG و فراوانی آلل G در بین دو گروه بیمار و کنترل تفاوت معناداری با هم دارند (جدول ۱) و با توجه به odds ratio حاصل می‌توان گفت که ژنوتیپ GG و آلل G با سقط مکرر خودبه‌خودی در جمعیت مورد مطالعه همراهی نشان داده و احتمال بروز این بیماری را به‌ترتیب به اندازه ۱/۹۷۱ و ۱/۹۸۳ برابر افزایش می‌دهند، لذا آلل G و ژنوتیپ GG در این جایگاه می‌توانند به‌عنوان عامل خطر در نظر گرفته شوند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برگر و همکاران (۲۰۱۰) بر روی جمیت زنان قفقازی همخوانی داشت، اما نسبت احتمال شانس حاصل در مطالعه آنها که برابر با ۱/۳۲ بود از نسبت احتمال شانس حاصل از مطالعه حاضر (odds ratio=۱/۹۷۱) کمتر بود (۱۴). همچنین در مطالعه دیگری بر روی جمعیت لهستان، نواک و همکاران (۲۰۱۶) همراهی معناداری برای ژنوتیپ‌های هموزیگوت مشاهده نکردند. با این وجود، نتایج آنها حاکی از نقش حفاظتی ژنوتیپ هتروزیگوت CT در برابر سقط خودبه‌خودی بود (۱۹). علاوه بر این، کارلینی و همکاران (۲۰۱۳) با مطالعه خود بر روی جمعیت مالی نشان دادند که ژنوتیپ TT در این جایگاه با افزایش سطح HLA-G ترشحی همراهی نشان می‌دهد (۲۰). در مطالعه حاضر در بررسی پلی‌مورفیسم rs1233334، علی‌رغم متفاوت بودن فراوانی‌های ژنوتیپی و آللی در بین دو گروه بیمار و کنترل، فراوانی هیچ‌کدام از آنها بین دو گروه از لحاظ آماری متفاوت نبود (جدول ۲). با این وجود، مقدار نسبت احتمال شانس (odds ratio) برای ژنوتیپ CC و آلل C به‌ترتیب ۱/۵۶۸ و ۱/۴۹ به‌دست آمد که حاکی از همراهی آنها با سقط مکرر است، ولی این همراهی از لحاظ آماری معنادار نبود. نتایج مطالعه حاضر در مورد این جایگاه با مشاهدات اوبر و همکاران (۲۰۰۳) بر روی جمعیت هاتریت در آمریکای شمالی متفاوت بود (۱۳). آنها در مطالعه خود نشان دادند که پلی‌مورفیسم rs1233334 با سقط مکرر همراهی دارد و آلل G باعث افزایش خطر ابتلاء به سقط مکرر می‌شود. همچنین آنها دریافتند که آلل G باعث به‌وجود آمدن یک دی‌نوکلئوتید CPG متیله می‌شود که می‌تواند کنفورماسیون DNA را تغییر داده و بر اتصال فاکتور رونویسی IRF1 تأثیر بگذارد (۱۳). برخلاف این نتایج، در مطالعه حاضر فراوانی آلل G در گروه بیمار کمتر از گروه کنترل بود. همچنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج مطالعه برگر و همکاران (۲۰۱۰) بر روی جمیت زنان قفقازی سازگار بود و آنها هم در مطالعه خود بین پلی‌مورفیسم rs1233334 و سقط مکرر همراهی معناداری مشاهده نکردند (۱۴). نتیجه مطالعه کارلینی و همکاران (۲۰۱۳) بر روی جمعیت مالی نیز با نتایج مطالعه حاضر مطابق بود و حاکی از عدم همراهی این پلی‌مورفیسم با سقط مکرر بود (۲۰). علاوه بر این نواک و همکاران (۲۰۱۶) نیز هیچگونه همراهی بین این پلی‌مورفیسم و سقط مکرر در جمعیت لهستان مشاهده نکردند (۱۹). در مطالعه‌ای بر روی جمعیت هندوستان، ارتباط پلی‌مورفیسم‌های دیگری از ناحیه بالادست ژن HLA-G با سقط مکرر نیز گزارش شده است. در آن مطالعه، آگراوال و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که سقط مکرر با پلی‌مورفیسم‌های rs1233335،

www.SID.ir

Archive of SID

rs915670 و rs114252012 همراهی معنی‌داری نشان می‌دهد (۲۱).

از جمله ژن‌هایی که همراهی پلی‌مورفیسم آنها با سقط مکرر در جمعیت ایرانی مورد مطالعات قرار گرفته است، می‌توان به پلی‌مورفیسم G103T ژن فاکتور VIII انعقادی اشاره کرد. در مطالعه اسکندری و همکاران (۲۰۱۳) همراهی آلل T و همچنین ژنوتیپ‌های TT و GT با اختلال سقط مکرر نشان داده شد (۲۲). علاوه بر این، فرهنگی و همکار (۲۰۱۵) با بررسی دو خواهر مبتلا به کمبود مادرزادی فاکتور VIII، نشان دادند که کمبود مادرزادی این فاکتور می‌تواند منجر به سقط مکرر راجعه شود (۲۳). خانبراری و همکاران (۲۰۱۷) با این فرض که تغییرات در ژن کد کننده آنزیم پروتئین تیروزین فسفاتاز می‌تواند در سقط مکرر دخیل باشد، پلی‌مورفیسم rs2488457 را که در پروموتر ژن PTPN22 قرار دارد، مورد بررسی قرار دادند، اما آنها نتوانستند تغییرات معنی‌داری در فراوانی این پلی‌مورفیسم در بین گروه بیمار و کنترل پیدا کنند (۲۴). همچنین حاجی فتحعلیا و همکاران (۲۰۱۸) ارتباط بین پلی‌مورفیسم HLA-G*0105N واقع در اگزون سوم ژن کدکننده HLA-G را با سقط مکرر در جمعیت ایران مورد بررسی قرار دادند، اما آنها در مطالعه خود همراهی معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم و بیماری سقط مکرر مشاهده نکردند (۲۵). با این وجود، علی‌زاده و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه خود همراهی معنی‌داری بین این پلی‌مورفیسم و بیماری سقط مکرر گزارش کردند (۲۶).

استفاده از فناوری‌های نوین از جمله NGS توانسته است به سبب‌شناسی ژنتیکی بیماری‌هایی از قبیل سقط مکرر کمک شایانی بکند (۲۷). کوئینترو روندرسو و همکاران (۲۰۱۷)، ۴۹ فرد مبتلا به سقط مکرر را با NGS بررسی کرده و ۲۷ واریانت کدکننده مرتبط با این اختلال را در ۲۲ ژن مختلف شناسایی کردند. بررسی‌های بیشتر با روش‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که این ژن‌ها همگی در مسیرهای مولکولی دخیل در لانه‌گزینی و باروری عمل می‌کنند (۲۸). در مطالعه دیگری کیائو و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده NGS به روش تعیین توالی کل اگزوم، ۷ جنین سقط شده از اعضای دو خانواده را برای یافتن علت ژنتیکی اختلال سقط مکرر بررسی کردند و جهش‌های هتروزیگوت مرکب در دو ژن DYNC2H1 و ALOX15 را به‌عنوان علل سقط مکرر در آن خانواده‌ها معرفی کردند (۲۹).

ناحیه 5'-URR ژن HLA-G حاوی پلی‌مورفیسم‌هایی است که در توالی‌های تنظیمی و یا نزدیک به آنها قرار دارند و بنابراین می‌توانند بیان واریانت‌های مختلف ژن HLA-G را متأثر سازند (۳۰). طی مطالعه‌ای، دیاس و همکاران (۲۰۱۸)، ۹ هاپلوتیپ شایع از این واریانت‌ها را کلون و تأثیر آنها را در سطح بیان ژنی بررسی کردند و نشان دادند که این واریانت‌ها می‌توانند بیان ژن HLA-G را تغییر دهند (۳۱). فراوانی این هاپلوتیپ‌ها در جمعیت‌های مختلف، متفاوت بوده و به پیش‌زمینه ژنتیکی آن جمعیته بستگی دارد (۳۲). در مطالعه حاضر، برای مشخص کردن هاپلوتایپ‌های شایع در جمعیت مورد مطالعه و همچنین همراهی هاپلوتایپ‌ها با سقط مکرر، ژنوتیپ‌های افراد بیمار و کنترل توسط نرم‌افزار SNP Analyzer مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که شایع‌ترین هاپلوتایپ، هاپلوتیپ H1 با توالی CG و فراوانی ۵۷/۳۹٪ و نادرترین هاپلوتایپ، هاپلوتایپ H4 با توالی GG و فراوانی ۶/۶۷٪ می‌باشد. همچنین هاپلوتایپ CG با نسبت احتمال شانس ۱/۸۱۶ همراهی مثبت با سقط مکرر نشان می‌دهد و می‌تواند به‌عنوان عامل خطر در نظر گرفته شود. در مقابل هاپلوتیپ GT با داشتن نسبت احتمال شانس ۰/۵۲۹ به‌عنوان یک فاکتور حفاظتی برای موفقیت بارداری در جمعیت مورد مطالعه محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری

پلی‌مورفیسم rs2249863 با سقط مکرر در جمعیت مورد مطالعه همراهی نشان می‌دهد، اما پلی‌مورفیسم rs1233334 همراهی نشان نمی‌دهد. همچنین هاپلوتایپ CG بالاترین هاپلوتایپ را در جمعیت زنان شمال غرب داشته و با بیماری سقط مکرر همراهی نشان می‌دهد. از طرف دیگر می‌توان گفت با توجه به

www.SID.ir

Archive of SID

نزدیکی نژادی بین جمعیت مورد مطالعه و زنان قفقازی، نتایج به‌دست آمده در این مطالعه با مطالعه روی زنان قفقازی نتیجه مشابهی نشان داده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز و همچنین از تمام افراد شرکت‌کننده در این مطالعه، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Ford HB, Schust DJ. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. Rev Obstet Gynecol 2009; 2(2):76-83.
2. Christiansen OB, Nielsen HS, Kolte AM. Future directions of failed implantation and recurrent miscarriage research. Reprod Biomed Online 2006; 13(1):71-83.
3. Pandey MK, Rani R, Agrawal S. An update in recurrent spontaneous abortion. Arch Gynecol Obstet 2005; 272(2):95-108.
4. Castelli EC, Ramalho J, Porto IO, Lima TH, Felício LP, Sabbagh A, et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. Front Immunol 2014; 5:476.
5. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simões RT, et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. Genes Immun 2010; 11(2):134-41.
6. Farzad F, Abediankenari S, Rahmani Z, Hashemi-Soteh MB, Hosseinikhah Z, Naghavian E. The role of HLA-G4 and G5 in threatened-abortion women. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences 2013; 23(106):2-10.
7. Ellis SA, Sargent IL, Redman CW, McMichael AJ. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. Immunology 1986; 59(4):595-601.
8. Hviid TV. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. Hum Reprod Update 2006; 12(3):209-32.
9. Moreau P, Contu L, Alba F, Lai S, Simoes R, Orrù S, et al. HLA-G gene polymorphism in human placentas: possible association of G*0106 allele with preeclampsia and miscarriage. Biol Reprod 2008; 79(3):459-67.
10. González A, Rebmann V, LeMaoult J, Horn PA, Carosella ED, Alegre E. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. Crit Rev Clin Lab Sci 2012; 49(3):63-84.
11. Shiroishi M, Kuroki K, Rasubala L, Tsumoto K, Kumagai I, Kurimoto E, et al. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(44):16412-7.
12. Hviid TV, Rizzo R, Melchiorri L, Stignani M, Baricordi OR. Polymorphism in the 5′ upstream regulatory and 3′ untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. Human immunology 2006; 67(1-2):53-62.
13. Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. Am J Hum Genet 2003; 72(6):1425-35.
14. Berger DS, Hogge WA, Barmada MM, Ferrell RE. Comprehensive analysis of HLA-G: implications for recurrent spontaneous abortion. Reprod Sci 2010; 17(4):331-8.
15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; 16(3):1215.
16. Christiansen OB, Nybo Andersen AM, Bosch E, Daya S, Delves PJ, Hviid TV, *et al*. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 2005; 83(4):821-39.
17. Hunt JS, Jadhav L, Chu W, Geraghty DE, Ober C. Soluble HLA-G circulates in maternal blood during pregnancy. American journal of obstetrics and gynecology 2000; 183(3):682-8.
18. Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. Cell Mol Life Sci 2011; 68(3):369-95.
19. Nowak I, Malinowski A, Barcz E, Wilczyński JR, Wagner M, Majorczyk E, et al. Possible Role of HLA-G, LILRB1 and KIR2DL4 Gene Polymorphisms in Spontaneous Miscarriage. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2016; 64(6):505-514.
20. Carlini F, Traore K, Cherouat N, Roubertoux P, Buhler S, Cortey M, et al. HLA-G UTR haplotype conservation in the Malian population: association with soluble HLA-G. PLoS One 2013; 8(12):e82517.
21. Agrawal D, Prakash S, Misra MK, Phadke SR, Agrawal S. Implication of HLA-G 5' upstream regulatory region polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortions. Reprod Biomed Online 2015; 30(1):82-91.
22. Eskandari F, Akbari MT, Zare S. Investigation the Association between Factor XIII Gene Polymorphism G103T with Recurrent Miscarriage in Iranian Patients. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2013; 16(76):19-24.
23. Farhangi H, Badiei Z. Report of some cases of recurrent pregnancy loss due to congenital deficiency of factor XIII. Iran J Obstet Gynecol Infertil 2015; 17(138):18-21.
24. Khanbarari F, Vakili M, Samadi M. The relationship between rs2488457 Polymorphism of PTPN22 Gene and Recurrent Pregnancy Loss (RPL). Iran J Obstet Gynecol Infertil 2017; 20(9):49-55.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Hajifathaliya Z, Najafipour R, Modarressi MH, Savad S, Rashvand Z. Association between the HLA-G* 0105N polymorphism and recurrent abortion in women. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences 2018; 21(6):30-37.
26. Alizadeh N, Mosaferi E, Farzadi L, Majidi J, Monfaredan A, Yousefi B, et al. Frequency of null allele of Human Leukocyte Antigen-G (HLA-G) locus in subjects to recurrent miscarriage. Int J Reprod Biomed 2016;4(7):459-64.
27. Quintero-Ronderos P, Laissue P. Genetic Variants Contributing to Early Recurrent Pregnancy Loss Etiology Identified by Sequencing Approaches. Reprod Sci 2019: 1933719119831769.
28. Quintero-Ronderos P, Mercier E, Fukuda M, González R, Suárez CF, Patarroyo MA, et al. Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. PLoS One 2017; 12(10):e0186149.
29. Qiao Y, Wen J, Tang F, Martell S, Shomer N, Leung PC, et al. Whole exome sequencing in recurrent early pregnancy loss. Mol Hum Reprod 2016; 22(5):364-72.
30. Craenmehr MHC, Nederlof I, Cao M, Drabbels JJM, Spruyt-Gerritse MJ, Anholts JDH, et al. Increased HLA-G Expression in Term Placenta of Women with a History of Recurrent Miscarriage Despite Their Genetic Predisposition to Decreased HLA-G Levels. Int J Mol Sci 2019; 20(3):625.
31. Dias FC, Bertol BC, Poras I, Souto BM, Mendes-Junior CT, Castelli EC, et al. The genetic diversity within the 1.4 kb HLA-G 5' upstream regulatory region moderately impacts on cellular microenvironment responses. Sci Rep 2018; 8(1):5652.
32. Meuleman T, Drabbels J, van Lith JMM, Dekkers OM, Rozemuller E, Cretu-Stancu M, et al. Lower frequency of the HLA-G UTR-4 haplotype in women with unexplained recurrent miscarriage. J Reprod Immunol 2018; 126:46-52.

www.SID.ir