



جمهوری اسلامی ایران

جهاد دانشگاهی

معاونت تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی – ابن سینا

پژوهشکده بیوتکنولوژی تولیدمثل

پژوهشکده آنتی بادی منوکلونال

پژوهشکده نانوبیوتکنولوژی

عنوان طرح:

مطالعه ارتباط موتاسیون های ژن های سایتوکاین ها با سندرم سقط مکرر

کد طرح:

۱۹۳۴-۳۳

مجریان طرح:

پروفسور محمود جدی تهرانی و دکتر سعید زارعی

سال تهیه گزارش

۱۳۹۳



معاونت تحقیقات و فناوری جهاد دانشگاهی
پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی – ابن سینا
پژوهشکده آنتی بادی منوکلونال
گروه پژوهشی: مهندسی آنتی ژن – آنتی بادی

عنوان طرح:

مطالعه ارتباط موتاسیون های ژن های سایتوکاین ها با سندرم سقط مکرر

کد طرح:

۱۹۳۴-۳۳

مجریان طرح:

پروفسور محمود جدی تهرانی و دکتر سعید زارعی

تاریخ شروع طرح

۱۳۹۰/۳/۹

بودجه تصویب شده

۷۸/۰۰۰/۰۰۰ ریال

سال تهیه گزارش

۱۳۹۳

مشخصات مسئول و همکاران طرح:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	پروفسور محمود جدی تهرانی	مجری	ایمونولوژی	استاد	۳۴۰
۲	دکتر سعید زارعی	مجری	MD	Ph.D	۲۴۰
۳	دکتر امیرحسین زرنانی	مشاوره تخصصی	ایمنی شناسی پزشکی	Ph.D	۱۴۰
۴	دکتر فرح ایدالی	مشاوره تخصصی	ایمنی شناسی	Ph.D	۴۰
۵	دکتر سهیلا عارفی	مشاور تخصصی پزشکی	تخصص زنان و زایمان	تخصص	۴۰
۶	شقایق امامی	آزمایشات مولکولی	سلولی و مولکولی	کارشناسی ارشد	۴۰
۷	اعظم همتی	آزمایشات مولکولی	سلولی و مولکولی	کارشناسی ارشد	۴۰
۸	مطهره بهادری	آزمایشات مولکولی	سلولی و مولکولی	کارشناسی	۶۰۰

Archive of SID



بازساخت نه‌عالی

Archive of SID

حقوق پروژه:

طرح پژوهشی " مطالعه ارتباط موتاسیون‌های ژن‌های سایتوکاین‌ها با سندرم سقط مکرر " با اعتبار تخصیص یافته از سوی معاونت تحقیقات و فناوری جهاد دانشگاهی در محل پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی - ابن سینا انجام گرفته است.

Archive of SID



تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری جهاد دانشگاهی و پرسنل پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی - ابن سینا که در اجرای این پروژه همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

Archive of SID

چکیده فارسی:

سقط خودبه‌خودی شایع‌ترین عارضه بارداری است و برای زوج‌هایی که تمایل به داشتن فرزند دارند، استرس‌های روحی- روانی فراوانی ایجاد می‌کند. سقط مکرر به بروز سه یا بیش از سه سقط، قبل از نیمه اول بارداری، اطلاق می‌شود و در هر ۳۰۰ بارداری یک مورد سقط مکرر حادث می‌شود. تمامی مراحل باروری مملو از مثال‌هایی است که نشان دهنده اهمیت همکاری تنگاتنگ سیستم ایمنی با تولید مثل می‌باشد و چنانچه در این راستا خللی وارد شود، منجر به سقط می‌شود. عوامل متعدد ایمنولوژیک برای این سندرم ذکر شده است که یکی از آن‌ها موتاسیون در ژن‌های سایتوکاین‌ها در مادران باردار است. پس از در نظر گرفتن شرایط ورود افراد گروه کنترل به مطالعه شامل: داشتن سه بارداری موفق و عدم وجود سابقه سقط و افراد گروه بیمار شامل سه سقط متوالی قبل از نیمه اول بارداری و همچنین عدم بیماری‌های اتوایمیون. DNA با روش Salting out استخراج گردید. نمونه‌ها برای موتاسیون‌های ژن‌های IL-1 β ، IL-1RN، IL-6، IL-10، IL-13 و IL-17 ژنوتایپ گردید. پس از انجام PCR برای هر جفت پرایمر، محصولات PCR در ۲۰۰ نمونه بیمار و ۱۰۰ نمونه از افراد سالم با استفاده از آنزیم مناسب برش داده شد، و با توجه به اندازه قطعات حاصل، ژنوتیپ افراد مشخص شد. مقایسه فراوانی این موتاسیون‌ها در دو گروه به وسیله آزمون Mann Whitney مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج با روش آماری نشان داد که در دو پلی‌مورفیسم ۵۹۲- و ۸۱۹- مربوط به اینترلوکین ده ارتباط معنی‌داری با سندرم سقط مکرر نشان داده است. در دیگر موتاسیون‌های بررسی شده اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

کلمات کلیدی:

سندرم سقط مکرر، پلی‌مورفیسم، اینترلوکین، سایتوکاین.

پیشگفتار

ازدواج سنگ بنای تشکیل خانواده است، لذا آن را رابطه‌ای تعریف می‌کنند که مرد و زن را برای مشارکت همیشگی در زندگی به هم می‌پیوندد. میل به داشتن فرزند و تداوم نسل، از انگیزه‌ها و اهداف مهمی است که همواره در دوره‌های مختلف تاریخی موجب ازدواج و تشکیل خانواده شده است و چنانچه در این راستا خللی وارد شود، غم و اندوه بزرگی بر زندگی افراد سایه می‌افکند. یکی از مشکلات برای داشتن فرزند و تداوم نسل، سندرم سقط مکرر می‌باشد.

۱-۱- تعریف مسئله

سقط مکرر شایع‌ترین اختلال دوره‌ی بارداری است، که در طول ۳ ماهه اول در ۲۰٪ از بارداری‌ها رخ می‌دهد. اساس ژنتیکی سقط مکرر به طور کامل شناخته نشده است، ولی بررسی‌های انجام شده نقش تعدادی از موتاسیون‌ها در ژن‌های مختلف، چندشکلی‌های این ژن‌ها و اختلالات سیتوزنتیک را در ایجاد این سندرم نشان داده‌اند. موتاسیون در ژن‌های سایتوکاین‌ها در مادران باردار به عنوان یکی از عوامل سقط جنین شناخته می‌شود. سایتوکاین‌ها، پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌های تعدیل‌کننده سیستم ایمنی هستند که فعالیت‌های این سیستم را کنترل و تنظیم می‌کنند. سطح تولید سایتوکاین‌ها تحت کنترل ژنتیک است. تعداد بسیاری از پلی‌مورفیسم‌های موجود در ژن‌های سایتوکاینی و پذیرنده‌های آنها در مناطق پروموتور، مناطق اینترونی و مناطق غیر قابل ترجمه واقع هستند. انواع T-helper که شامل Th_1 و Th_2 می‌باشد و هر کدام از آنها سایتوکاین‌های ویژه‌ای را ترشح می‌کنند.

در انسان پاسخ سیستم ایمنی در بارداری طبیعی به سمت Th_2 گرایش یافته، در حالی که در زنان با سابقه سقط مکرر به سمت Th_1 گرایش می‌یابد. نقش Th_1 بصورت التهابی و Th_2 بصورت ضد التهابی بیان می‌شود. یکی از عواملی که باعث سقط مکرر می‌شود، افزایش نسبت Th_1 به Th_2 می‌باشد. در این پژوهش به بررسی موتاسیون ژن‌های سایتوکاین‌ها شامل: $IL-1\beta$ با سه موتاسیون (-31 T/C, +3954 C/T, +11100T/C, +8061 C/T, +9589 A/T, IL-6 با یک موتاسیون (-174 C/G, IL-10 با سه موتاسیون (-1082 A/G, -819 C/T, -592 A/C, IL-13 با دو موتاسیون (-1055 G/A, +2044 G/A, IL-17 با یک موتاسیون (-197 G/A) پرداخته شده است.

۱-۲- ضرورت پژوهش

نظر به اینکه جمعیت مردم ایران از نظر ژنتیکی با جمعیت‌های دیگر متفاوت است، لذا موتاسیون ژن‌های سایتوکاین‌ها در ایران ممکن است با دیگر جوامع متفاوت باشد. در نتیجه این مطالعه می‌تواند تصویری از ترکیب ژنی مردم ایران در ارتباط با موتاسیون‌های مربوط به ژن‌های سایتوکاین‌ها و ارتباط آنها با سقط مکرر را نشان دهد.

۱-۳- اهداف پژوهش

به طور کلی هدف از انجام هر پژوهش دستیابی به یک هدف اصلی و چندین هدف فرعی است در واقع اهداف فرعی مقدمه رسیدن به هدف اصلی است. هدف آرمانی این پژوهش بررسی ارتباط موتاسیون‌های ژنی سایتوکاین‌ها به عنوان فاکتورهای خطر ژنتیکی با سندرم سقط مکرر می‌باشد. این طرح شامل بررسی ارتباط موتاسیون‌ها به طور جداگانه و هم‌چنین بر همکنش بین آنها و سندرم فوق می‌باشد. ارتباط موتاسیون‌ها در ژن‌های سایتوکاینی با سندرم سقط مکرر به عنوان فاکتورهای خطر ژنتیکی برای این سندرم هر یک به طور جداگانه و نیز به صورت هتروزیگوس مرکب بررسی می‌شود. یکی از اهداف فرعی این پژوهش محاسبه خطر ابتلا به سندرم سقط مکرر در افراد دارای موتاسیون‌های ژنی سایتوکاین‌های مورد نظر می‌باشد.

- ۱- تعیین فراوانی موتاسیون ژن IL1RN در بیماران سقط مکرر و گروه کنترل.
- ۲- تعیین فراوانی موتاسیون ژن $IL-1\beta$ در بیماران سقط مکرر و گروه کنترل.
- ۳- تعیین فراوانی موتاسیون ژن IL-6 در بیماران سقط مکرر و گروه کنترل.
- ۴- تعیین فراوانی موتاسیون ژن IL-10 در بیماران سقط مکرر و گروه کنترل.
- ۵- تعیین فراوانی موتاسیون ژن IL13 در بیماران سقط مکرر و گروه کنترل.
- ۶- تعیین فراوانی موتاسیون ژن IL17 در بیماران سقط مکرر و گروه کنترل.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل ۱ مقدمه.....
۱-۱	۱-۱-۱- سقط مکرر.....
۱-۱-۱	۱-۱-۱-۱- اتیولوژی.....
۲-۱-۱	۲-۱-۱- عوامل ژنتیکی.....
۳-۱-۱	۳-۱-۱- عوامل انعقادی.....
۴-۱-۱	۴-۱-۱- اختلالات آناتومیک.....
۵-۱-۱	۵-۱-۱- اختلالات آندوکراین.....
۶-۱-۱	۶-۱-۱- علل عفونی.....
۷-۱-۱	۷-۱-۱- علل ایمنی.....
۸-۱-۱	۸-۱-۱- عوامل دیگر.....
۲-۱	۲-۱- سیستم ایمنی.....
۳-۱	۳-۱- سایتوکاین‌ها.....
۱-۳-۱	۱-۳-۱- کشف سایتوکاین‌ها و خصوصیات آن‌ها.....
۲-۳-۱	۲-۳-۱- ویژگی سایتوکاین‌ها.....
۳-۳-۱	۳-۳-۱- طبقه بندی سایتوکاین‌ها.....
۴-۳-۱	۴-۳-۱- نقش سایتوکاین‌ها در تمایز سلول‌های Th_1 و Th_2 در پاسخ‌های ایمنی.....
۴-۱	۴-۱- اینترلوکین‌ها.....
۱-۴-۱	۱-۴-۱- اینترلوکین یک.....
۱-۱-۴-۱	۱-۱-۴-۱- گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک.....
۲-۴-۱	۲-۴-۱- اینترلوکین شش.....
۳-۴-۱	۳-۴-۱- اینترلوکین ده.....
۴-۴-۱	۴-۴-۱- اینترلوکین سیزده.....
۵-۴-۱	۵-۴-۱- اینترلوکین هفده.....
۵-۱	۵-۱- مطالعات انجام گرفته بر روی نقش پلی مورفیسم‌های سایتوکاین‌ها در سقط مکرر.....
۲	فصل ۲- مواد و روش‌ها.....
۱-۲	۱-۲- جمعیت مورد مطالعه و نحوه نمونه گیری.....
۱-۱-۲	۱-۱-۲- معیار ورود زنان به مطالعه.....
۲-۱-۲	۲-۱-۲- معیار خروج زنان از مطالعه.....
۲-۲	۲-۲- تهیهی محلول‌های مورد نیاز.....
۱-۲-۲	۱-۲-۲- روش استخراج.....
۳-۲	۳-۲- الکتروفورز روی ژل آگارز.....
۱-۳-۲	۱-۳-۲- مواد و وسایل مورد نیاز.....
۲-۳-۲	۲-۳-۲- تهیه بافر TAE 50X.....
۴-۲	۴-۲- آنالیز کمی و کیفی DNA.....
۱-۴-۲	۱-۴-۲- آنالیز کیفی DNA.....
۲-۴-۲	۲-۴-۲- آنالیز کمی DNA.....

- ۵-۲- ژنوتایپ کردن نمونه‌ها (ژنوتایپینگ)..... ۱۷
- ۱-۵-۲- انتخاب پرایمرهای مناسب برای هر موتاسیون..... ۱۷
- ۱-۱-۵-۲- طراحی آغازگر..... ۱۷
- ۲-۵-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز..... ۱۸
- ۶-۲- مواد و تهیه ژل آگارز..... ۱۸
- ۱-۶-۲- مواد و محلول‌های لازم برای الکتروفورز ژل آگارز..... ۱۸
- ۲-۶-۲- نحوه تهیه ژل آگارز ۱/۵٪..... ۱۹
- ۷-۲- روش انجام RFLP بر روی محصولات PCR..... ۲۰
- ۳-۸-۲- روش‌های آماری مورد استفاده..... ۲۱
- ۳- نتایج..... ۲۲
- ۱-۳- بررسی و دموگرافیک جمعیت مورد مطالعه..... ۲۳
- ۲-۳- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده..... ۲۳
- ۳-۳- انتخاب پرایمرهای مناسب..... ۲۵
- ۴-۳- شرایط انجام PCR..... ۲۶
- ۱-۴-۳- نتایج PCR..... ۲۸
- ۵-۳- نتایج چندشکلی در طول قطعات محدود RFLP..... ۳۰
- ۱-۵-۳- پلی‌مورفیسم خانواده اینترلوکین یک بتا..... ۳۱
- ۱-۱-۵-۳- اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۹۵۴+..... ۳۱
- ۲-۱-۵-۳- اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۱-..... ۳۱
- ۳-۱-۵-۳- اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۵۱۱-..... ۳۱
- ۲-۵-۳- پلی‌مورفیسم خانواده گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک..... ۳۲
- ۱-۲-۵-۳- گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۹۵۸۹+..... ۳۳
- ۲-۲-۵-۳- گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۸۰۶۱+..... ۳۴
- ۳-۲-۵-۳- گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۱۱۱۰۰+..... ۳۵
- ۳-۵-۳- پلی‌مورفیسم اینترلوکین شش..... ۳۶
- ۱-۳-۵-۳- اینترلوکین شش در موقعیت ۱۷۴-..... ۳۷
- ۴-۵-۳- پلی‌مورفیسم خانواده اینترلوکین ده..... ۳۷
- ۱-۴-۵-۳- اینترلوکین ده در موقعیت ۵۹۲-..... ۳۸
- ۲-۴-۵-۳- اینترلوکین ده در موقعیت ۸۱۹-..... ۳۹
- ۳-۴-۵-۳- اینترلوکین ده در موقعیت ۱۰۸۲-..... ۴۰
- ۵-۵-۳- پلی‌مورفیسم خانواده سیزده..... ۴۱
- ۱-۵-۵-۳- اینترلوکین سیزده در موقعیت ۲۰۴۴+..... ۴۱
- ۲-۵-۵-۳- اینترلوکین سیزده در موقعیت ۱۰۵۵-..... ۴۲
- ۶-۵-۳- پلی‌مورفیسم خانواده اینترلوکین هفده..... ۴۳
- ۱-۶-۵-۳- اینترلوکین هفده در موقعیت ۱۹۷-..... ۴۳
- ۶-۳- نتایج بررسی‌های آماری..... ۴۴
- ۴- بحث و پیشنهادات..... ۴۷
- ۱-۴- پلی‌مورفیسم سایتوکاین‌های پیش التهابی در سندرم سقط مکرر..... ۴۸
- ۱-۱-۴- پلی‌مورفیسم خانواده اینترلوکین یک بتا..... ۴۸

- ۴-۱-۲- پلی مورفیسیم خانواده گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک..... ۴۸
- ۴-۱-۳- پلی مورفیسیم خانواده شش..... ۴۸
- ۴-۱-۴- پلی مورفیسیم خانواده اینترلوکین ده..... ۴۹
- ۴-۱-۵- پلی مورفیسیم خانواده اینترلوکین سیزده..... ۴۹
- ۴-۱-۶- پلی مورفیسیم خانواده اینترلوکین هفده..... ۴۹
- ۴-۲- نتیجه گیری..... ۴۹
- ۴-۳- پیشنهادات..... ۵۰
- ۴-۴- پیوست..... ۵۱
- ۴-۵- منابع..... ۵۳
- خلاصه انگلیسی..... ۵۸

Archive of SID

فهرست اشکال، جداول و نمودارها

صفحه	عنوان
۶	شکل ۱-۲- اعمال سایتوکاین‌ها
۷	شکل ۱-۳- تمایز سلول‌های T کمکی
۸	شکل ۱-۴- اثرات مختلف اینترلوکین یک
۱۰	شکل ۱-۵- مراحل تشکیل اینترلوکین ۱۷ از Th17
۱۶	شکل ۱-۲- الکتروفورز برای تعیین آنالیز کیفی DNA
۱۸	شکل ۲-۲- بررسی خصوصیات فیزیکی پرایمرها با نرم افزار Gene Runner
۲۰	شکل ۲-۳- شمایی از مراحل بیوانفورماتیکی انتخاب آنزیم‌ها
۲۴	شکل ۱-۳- بررسی غلظت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ
۲۵	شکل ۲-۳- الکتروفورز نمونه های DNA بر روی ژل آگاروز ۱٪
۲۸	شکل ۳-۳- الکتروفورز محصول PCR برای IL-1beta
۲۸	شکل ۴-۳- الکتروفورز محصول PCR برای IL-1RN
۲۹	شکل ۳-۵- الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین شش
۲۹	شکل ۳-۶- الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین ده
۲۹	شکل ۳-۷- الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین سیزده
۳۰	شکل ۳-۸- الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین هفده
۳۰	شکل ۳-۹- نتایج الکتروفورز RFLP پلی مورفیسم‌های اینترلوکین یک بتا
۳۳	شکل ۳-۱۰- نتایج الکتروفورز RFLP پلی مورفیسم‌های IL-1RN
۳۶	شکل ۳-۱۱- نتایج الکتروفورز RFLP پلی مورفیسم اینترلوکین شش
۳۸	شکل ۳-۱۱- نتایج الکتروفورز RFLP پلی مورفیسم اینترلوکین ده
۴۱	شکل ۳-۱۳- نتایج الکتروفورز RFLP پلی مورفیسم‌های اینترلوکین سیزده
۴۱	شکل ۳-۱۴- نتایج الکتروفورز RFLP پلی مورفیسم اینترلوکین هفده
۳	جدول ۱-۱- فراوانی عوامل سقط مکرر در ۵۴۵ زن مبتلا به RSA
۲۳	جدول ۱-۳- نتایج دموگرافیک وزن، قد، سن و سن اولیه بارداری در دو گروه بیماران سقط مکرر و گروه کنترل
۲۴	جدول ۲-۳- بررسی DNA
۲۵	جدول ۳-۳- توالی جفت پرایمرها مورد استفاده در این پژوهش
۲۶	جدول ۳-۴- جایگاه برش آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش
۲۷	جدول ۳-۵- برنامه PCR بهینه سازی شده برای هر جفت پرایمر
۳۱	جدول ۳-۶- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین ۱ بتا
۳۲	جدول ۳-۷- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۱-
۳۲	جدول ۳-۸- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی یک بتا در موقعیت ۵۱۱-
۳۴	جدول ۳-۹- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۹۵۸۹+
۳۵	جدول ۳-۱۰- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی آنتاگونیست اینترلوکین یک
۳۶	جدول ۳-۱۱- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک
۳۷	جدول ۳-۱۲- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین شش
۳۸	جدول ۳-۱۳- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین ده در موقعیت ۵۹۲-
۳۹	جدول ۳-۱۴- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین ده در موقعیت ۸۱۹-
۴۰	جدول ۳-۱۵- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین ده در موقعیت ۱۰۸۲-
۴۲	جدول ۳-۱۶- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین سیزده در موقعیت ۲۰۴۴+

- جدول ۳-۱۷- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین سیزده در موقیت ۱۰۵۵- ۴۲
- جدول ۳-۱۸- مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین هفده ۴۴
- جدول ۳-۱۹- بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم‌های سایتوکاین‌ها بر اساس آزمون χ^2 برای سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه شاهد و نمونه ۴۵
- جدول ۳-۲۰- بررسی اثر وجود هر پلی‌مورفیسم بر وقوع سقط مکرر با استفاده از مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره ۴۶
- جدول ۳-۲۱- بررسی ارتباط بین انواع پلی‌مورفیسم‌های اینترلوکین ده با یکدیگر ۴۶
- نمودار ۳-۱- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-1 β در موقیت ۳۹۵۴- ۳۱
- نمودار ۳-۲- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-1 β در موقیت ۳۱- ۳۲
- نمودار ۳-۳- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-1 β در موقیت ۵۱۱ ۳۳
- نمودار ۳-۴- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-1RN در موقیت ۹۵۸۹+ ۳۴
- نمودار ۳-۵- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-1RN در موقیت ۸۰۶۱+ ۳۵
- نمودار ۳-۶- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-1RN در موقیت ۱۱۱۰۰+ ۳۶
- نمودار ۳-۷- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-6 در موقیت ۱۷۴- ۳۷
- نمودار ۳-۸- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-10 در موقیت ۵۹۲- ۳۹
- نمودار ۳-۹- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-10 در موقیت ۸۱۹- ۴۰
- نمودار ۳-۱۰- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-10 در موقیت ۱۰۸۲- ۴۱
- نمودار ۳-۱۱- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-13 در موقیت ۲۰۴۴+ ۴۲
- نمودار ۳-۱۲- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-13 در موقیت ۱۰۵۵- ۴۳
- نمودار ۳-۱۳- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی IL-17 در موقیت ۱۹۷- ۴۴

Archive



فصل اول پیش گفتار

Archive of SID

مقدمه:

۱-۱- سقط مکرر

سازمان WHO^۱ سقط را از دست دادن جنین یا رویان تا وزن ۱۵۰ گرم، پیش از هفته ۲۲ بارداری تعریف می‌کند (۱). سقط یک اتفاق متداول در طی دوران بارداری است و این یکی از مشکلاتی است که همسران جوان با آن روبه‌رو هستند، که باعث نگرانی و ناکامی آنها می‌شود. در واقع حدود ۲۰ درصد بارداری‌هایی که از نظر کلینیکی تشخیص داده می‌شوند، در نیمه اول بارداری سقط می‌شوند (۲).

سقط شامل انواع مختلف است:

- ۱- سقط ناقص: سقطی است که محتویات رحمی به طور کامل تخلیه نشود.
- ۲- سقط فراموش شده^۲: زمانی رخ می‌دهد که ۶-۸ هفته از مرگ جنین در رحم گذشته باشد.
- ۳- سقط کامل^۳: سقطی است که محتویات رحم بطور کامل تخلیه شود.
- ۴- سقط مکرر خود به خودی^۴: هنگامی که سه سقط پی در پی و بدون دخالت و تاثیر دارو یا وسایل مکانیکی صورت - گیرد.
- ۵- سقط عمد^۵ (۳).

سقط مکرر^۶ در منابع مختلف تعاریف متفاوتی دارد. در اغلب منابع سقط مکرر را به صورت سه یا بیش از سه سقط متوالی، پیش از هفته ۲۴ بارداری تعریف می‌کنند. گرچه گاه تعریف مدرنی از سقط مکرر به صورت دو یا بیش از دو سقط متوالی پیش از هفته ۲۰ نیز ارائه می‌گردد. Colaum^۷ در مطالعه‌ی خود نشان داد که ۵ درصد زوج‌ها، دو سقط مکرر و دو درصد آنها سه سقط مکرر یا بیشتر را تجربه خواهند کرد.

سقط مکرر از شایع‌ترین عارضه‌ی حاملگی محسوب می‌شود و موجب استرس شدید در زوج‌های مشتاق فرزند می‌شود (۱). سقط مکرر به دو گروه سقط مکرر اولیه و ثانویه تفکیک می‌گردد. در مورد سقط اولیه فرزند زنده‌ای متولد نمی‌شود، ولی در سقط مکرر ثانویه یک یا چند تولد زنده و پس از آن سقط‌های پشت سر هم رخ می‌دهد (۳). منشا سقط مکرر خود به خودی (RSA) چند عاملی^۷ است، که در نیمی از موارد علت آن ناشناخته باقی می‌ماند. اما بررسی‌های سیتوژنتیکی نمونه‌های سقط نشان داده است، که در ۵۰٪ موارد رویان یا جنین‌های سقط شده از نظر سیتوژنتیکی غیرطبیعی بودند (۴). اساس ژنتیکی سقط مکرر خودبخودی جنین به طور ناچیزی شناخته شده است. مواتسیون‌های ژن‌های منفرد، پلی‌ژنیک و فاکتورهای سیتوژنتیکی با RSA مرتبطاند (۳).

۱-۱-۱- اتیولوژی

در مورد علل سقط مکرر باید گفت که حالت غیرطبیعی کروموزومی والدین تنها علت غیرقابل بحث سقط مکرر است. چنین حالات غیرطبیعی کروموزومی در ۵ درصد زوج‌هایی که دچار سقط مکرر می‌شوند، حادث می‌شود. از سایر علل می‌توان به حالات غیرطبیعی شکل رحم، مشکلات هورمونی، عفونت‌ها، فاکتورهای ایمنی، انعقاد خون (ترومبوفیلی) و همچنین علل متفرقه دیگر اشاره کرد. البته بعد از ارزیابی واقعی در ۶۰ درصد موارد، سقط مکرر غیرقابل توجیه باقی می‌ماند (۵-۷).

¹ World Health Organization

² Missed Abortion

³ Complet Abortion

⁴ Recurrent Spontaneous Abortion : RSA

⁵ Induced Abortion

⁶ Recurrent Spontaneous Abortion : RSA

⁷ Multi Factorial

۱-۱-۲- عوامل ژنتیکی

یکی از دلایل شناخته شده سقط و سقط مکرر، اشکالات ژنتیکی است. اختلالات کروموزومی ممکن است به علت وراثت اختلالات ساختمانی و جابجایی‌های قطعات کروموزومی در کروموزوم‌های والدین و یا اختلال در تعداد کروموزوم جنین و یا اشکال ساختمانی در کروموزوم‌های جنین اتفاق بیفتد. در واقع تعداد زیادی از جنین‌های با اشکالات کروموزومی سقط می‌شوند و تعداد کمی از آنها تولد زنده را تجربه خواهند کرد (۸). اختلال کروموزومی جنین یکی از علل عمده سقط خودبخودی و بی‌علت است که ۵۰٪ از سقطها را شامل می‌شود (۹). از طرفی دیگر، فراوانی کاریوتایپ طبیعی جنین در سقطها افزایش یافته که نشانه اهمیت بیشتر فاکتورهای مادری در عدم بارداری موفق است (۱۰، ۱۱).

۱-۱-۳- عوامل انعقادی

اخیراً توجه عمده‌ای به نقش ترومبوفیلی ذاتی در سقط مکرر معطوف شده است. در این گروه هتروژن، اختلالات منجر به افزایش ترومبوز شریانی و یا وریدی خواهد شد. ارتباط آن‌ها با سقط بصورت تغییر در رشد و توسعه جفت بخصوص در رشد بافت عروقی آن می‌باشد. بافت عروقی غیرطبیعی جفت و ترومبوز نامناسب جفتی، این وضعیت‌های ترومبوفیلیک را با سقط مرتبط کرده است. این موارد عبارتند از: هایپر هموسیستتینمی و فعال شدن مقاومت به پروتین C همراه با جهش در فاکتور V لیدن، کمبود پروتین C و S، جهش در پروترومبین و جهش در آنٹی‌ترومبین III (۱۲، ۱۳).

۱-۱-۴- اختلالات آناتومیک

اختلالات آناتومیک در سرویکس یا رحم با سقط‌های مکرر همراه می‌باشند، که این علل آناتومیک ممکن است مادرزادی و یا اکتسابی باشد. تمامی اختلالات سیستم تناسلی با سقط خود به خودی ایزوله و سقط مکرر همراه هستند. ناهنجاری‌های آناتومیک اکتسابی به سقط‌های مکرر می‌انجامد، این اختلالات شامل چسبندگی‌های درون رحمی، فیبروئیدهای رحمی و آندومترئوز می‌باشد (۱۴، ۱۵).

۱-۱-۵- اختلالات آندوکراین

اختلالات آندوکراین تاثیر خود را در فاز فولیکولر، (چرخه‌ای که باروری در آن اتفاق می‌افتد)، یا حتی زودتر اعمال می‌کنند. تغییر در رشد فولیکولر و اوولاسیون، ممکن است به اختلالات در انتقال و رشد بلاستوسیت، تغییر در پذیرش بلاستوسیت در حال لانه‌گزینی و عملکرد نامناسب جسم زرد منجر شود. سقط خودبه‌خودی قبل از هفته ۱۰ حاملگی ناشی از تغییر در تولید یا مصرف پروژسترون طبیعی می‌باشد که شامل نارسایی جسم زرد، انتقال در تحویل پروژسترون به رحم یا مصرف نامناسب پروژسترون توسط دسیدوای رحم می‌گردد. سایر عوامل آندوکراین همراه با سقط مکرر عبارتند از: دیابت قندی، بیماری تیروئید و هایپر پرولاکتینمی و کاهش توانایی تخمدان (۱۶، ۵).

۱-۱-۶- علل عفونی

همانگونه که در جدول ۱-۱ آمده است، عفونت‌ها علت ۵/۸٪ از تمام موارد سقط می‌باشند. فراوانی تیترا آنتی‌بادی بر علیه کلامیدیا تراکوماتیس در زنان با سقط مشاهده شده است. اما تاکنون ارتباطی بین عفونت و آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس و سقط مکرر در جمعیت یافت نشده است. نقش آلودگی‌های توکسوپلازما، سرخجه، سیفلیس مادرزادی و ویروس‌ها (ویروس‌های هرپس سیمپلکس) اغلب در سقط مکرر بی‌اهمیت بوده و در غربالگری‌های متداول توصیه نمی‌شود (جدول ۱-۱). علاوه بر این تحقیقات

گسترده‌ای در این زمینه انجام گرفته که موید آن است که ویروس سیتومگالو ویروس‌ها در بدن باقی‌مانده و از آنجایی که در درمان خاصی ندارد، در حاملگی‌های بعدی فعال شده و منجر به پاسخ‌های ایمنی سلولی و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی و در نتیجه منجر به سقط می‌گردد (۶،۱۷).

جدول ۱-۱: فراوانی عوامل سقط مکرر در ۵۴۵ زن مبتلا به RSA (۱۸).

فاکتور	فراوانی (%)
ژنتیک	۳/۱
هورمونی	۲۰/۲
آناتومیک	۲۱/۶
ایمنولوژی	۲۵
عفونت	۵/۸

۱-۱-۷- علل ایمنی

دلایل ایمنولوژیک سقط مکرر شامل فاکتورهای اتوایمیون و آلوایمیون است. عدم تعادل سیستم‌های ایمنی مادر در پاسخ به جنین آلوگرافت و وجود آنتی‌بادی‌ها در بدن می‌تواند موجب سقط مکرر خود به خودی شود (۱۹). آنتی‌بادی ضد تیروئید با خطر بالای سقط مکرر همراه است. خانم‌هایی که این آنتی‌بادی‌ها را دارند، بیماری تیروئید آشکار ندارند، بنابراین اتوآنتی‌بادی ضد تیروئید یک مارکر غیر وابسته برای افزایش خطر سقط است (۲۰). یکی از مکانیزم آلوایمیون کاهش آنتی‌بادی‌های بلوک کننده^۱ می‌باشد، که مادر علیه HLA پدري آنتی‌بادی می‌سازد که این آنتی‌بادی‌ها با باند شدن با آنتی‌ژن‌های پدري جنین مانع فعال شدن سیستم سایتوتوکسیک علیه جنین می‌شود. در صورت شباهت زیاد HLA پدر و مادر سقط مکرر ممکن است رخ دهد (۲۱). فقدان پروتئین‌های تنظیم کننده کمپلمان در سطوح سلول‌های جنین می‌تواند سبب تخریب سلول‌های جفت به وسیله سیستم کمپلمان شده و در نهایت به سقط جنین منجر شود (۲۲).

یک فاکتور اتوایمیون دیگر که در سقط مکرر اهمیت دارد، تغییر در سلول‌های ایمنی مقیم در آندومتر است. سلول‌های کشنده طبیعی^۲ (NK) که لنفوسیت‌های گرانولر بزرگی هستند، در دسیدوا در اوایل حاملگی دیده می‌شوند. این سلول‌ها می‌توانند پس از تحریک با اینترلوکین ۲، سلول‌های تروفوبلاست انسانی را از بین ببرند. در خانم‌های با سقط مکرر، فعالیت سلول‌های کشنده (NK) بیشتر از گروه کنترل است، این احتمال وجود دارد که تغییر در سلول‌های ایمنی مقیم در آندومتر باعث تغییر در ترشح سایتوکاین می‌شود (۲۳).

¹ Maternal blocking antibody

² Natural killer cells (NK Cells)

۱-۱-۸- عوامل دیگر:

از علل دیگر می‌توان به فاکتور محیطی^۱ اشاره کرد که زنان را مستعد سقط می‌کنند، هرچند نحوه ارتباط این فاکتورها با سقط مکرر هنوز روشن نشده است. این عوامل شامل استعمال دخانیات، مصرف کافئین و الکل است. استعمال دخانیات باعث هیپوکسی می‌شود که یکی از تنظیم‌کننده‌های بیان آنژیوپوئین است. بنابراین استعمال دخانیات بر روی عروق جفت تاثیر می‌گذارد و همچنین گازهای بی‌هوشی و تراکلرواتیلن نیز احتمال سقط را بالا می‌برد. فاکتورهای تغذیه‌ای غیر از مصرف الکل و استعمال دخانیات نیز می‌توانند در ایجاد زمینه برای سقط نقش داشته باشند. رژیم غذایی با فقر سبزیجات، میوه جات و شیر و محصولات لبنی می‌توانند افراد را مستعد سقط نمایند (۱،۲۴). فاکتورهای روانی نظیر استرس، زنان را برای سقط و سقط مکرر مستعد می‌نمایند. تولید افزوده TNF- α در بیماران با سابقه سقط در سه ماهه اول بارداری که استرس بالایی داشتند، مشاهده شده است. بنابراین فاکتورهای روانی عصبی ایمنی از عوامل سقط مکرر می‌باشند. بررسی‌ها نشان داده است که استرس با تعادل Th1/Th2 مرتبط است. استرس تجربه شده توسط یک زن باردار سیستم‌های هشدار دهنده را فعال ساخته و منجر به پس زدن جنین می‌شود (۳).

۱-۲- سیستم ایمنی

انسان در محیطی زندگی می‌کند که عوامل و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای متعددی سلامتی وی را بطور دائم تهدید می‌کند. پوست و پرده‌های مخاطی به عنوان یک سد حفاظتی از ورود این عوامل بیماری‌زا به بدن جلوگیری می‌نمایند. با وجود این، عبور عوامل بیماری‌زا از نواحی آسیب دیده و ضعیف این سد حفاظتی امکان پذیر می‌باشد. بنابراین نیاز به یک سیستم دقیق و تخصص یافته برای جلوگیری از عملکرد این عوامل بیماری‌زا کاملاً مشهود است (۲۵).

واژه‌ی ایمنی^۲ از کلمه‌ی لاتین ایمونیت^۳ برگرفته شده است که واژه‌ی فوق به معنای معافیت از پیگردهای قانونی است که به سناتورهای رومی در طی دوره مسئولیت‌شان اهدا می‌شده است. سلول و مولکول‌های مسئول در ایمنی، سیستم ایمنی را به وجود آورده و پاسخ هماهنگ و گسترده‌ی آنها در مقابل عوامل بیگانه پاسخ ایمنی خوانده می‌شود. سیستم ایمنی توانایی شناسایی طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا را دارد. عملکرد سیستم ایمنی بر علیه عوامل خارجی بیماری‌زا بسیار پیچیده است. از آنجایی که پاتوژن‌ها می‌توانند به سرعت رشد و گسترش یابند و با محیط سازش پیدا کنند و همچنین این توانایی را بدست آورند که بتوانند خود را از سیستم ایمنی مخفی نمایند، تمام این عوامل دست به دست هم داده تا عامل بیماری‌زا با موفقیت میزبان خود را آلوده کند (۲۵).

۱-۳- سایتوکاین‌ها^۴

سایتوکاین‌ها پروتئین‌هایی هستند که توسط سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی ترشح می‌شوند و بسیاری از اعمال این سلول‌ها را تحت کنترل خویش دارند. سایتوکاین‌ها در پاسخ به میکروب‌ها و سایر آنتی‌ژن‌ها تولید می‌شوند و سایتوکاین‌های مختلف، پاسخ‌های گوناگون سلول‌های درگیر در ایمنی و التهاب را تحریک می‌نمایند. در مرحله فعال شدن پاسخ‌های ایمنی اکتسابی، سایتوکاین‌ها رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها را تحریک می‌کنند و در مراحل عملیاتی ایمنی ذاتی و اکتسابی، سلول‌های عملیاتی مختلف را به منظور حذف میکروب‌ها و سایر آنتی‌ژن‌ها فعال می‌نمایند (۳۰-۲۶).

¹ Environmental Factor

² Immunity

³ Immunitas

⁴ Cytokines

۱-۳-۱- کشف سایتوکاین‌ها و خصوصیات آن‌ها

مطالعات اولیه درباره‌ی سایتوکاین‌ها در فاصله زمانی ۱۹۵۰ تا ۱۹۷۰ توسعه یافت و بیشتر، توصیف عوامل پروتئینی متعددی بود که از سلول‌های مختلفی تولید می‌شدند و فعالیت ویژه‌ای را در سیستم‌های سنجش بیولوژیک ایجاد می‌کردند. برای مثال در این زمینه می‌توان از اینترون‌های ضد ویروس، مواد تب‌زا و عامل فعال‌کننده‌ی ماکروفاژها یاد کرد که در همین زمان کشف شدند. مرحله دوم تحقیق در مورد سایتوکاین‌ها در دهه‌ی ۱۹۷۰ توسعه بسیاری یافت و بیشتر به خالص سازی و تعیین خصوصیات سایتوکاین‌ها متعدد و تولید آنتی بادی‌های اختصاصی خنثی کننده‌ی اثر آنها معطوف گردید. در این دوره فرضیه مهمی پیشنهاد شد مبنی بر این که سایتوکاین‌ها را اساساً لکوسیت‌ها تولید می‌کنند و عمل اولیه آنها بر لکوسیت‌های دیگر است به همین دلیل آنها را اینترلوکین (IL) نام نهادند.

دهه‌ی ۱۹۸۰ را باید دوران طلایی برای پژوهش‌های سایتوکاین‌ها نام نهاد. چرا که در این دوره بود که با کلون کردن مولکولی و بروز مولکول‌های هر سایتوکاین و تولید آنتی بادی‌های خنثی کننده کاملاً اختصاصی مشخصات آن‌ها تعیین شد.

۱-۳-۲- ویژگی سایتوکاین‌ها

سایتوکاین‌ها با جرم مولکولی نسبتاً کم و اغلب شامل فقط یک زنجیره منفرد هستند. تمام آن‌ها فرایندهای بیولوژیکی مهم رشد سلول، فعال شدن سلول‌های التهاب ایمنی و ترمیم بافتی را تنظیم می‌کنند. آنها از طریق اتصال به پذیرنده‌های سایتوکاینی اختصاصی و سپس به راه اندازی مسیرهای انتقال پیام و پیامبرهای ثانویه، بر سلول‌های هدف اثر می‌گذارد. این امر منجر به فعال شدن ژن می‌گردد که موجب تقسیم میتوزی، رشد و تمایز، مهاجرت یا آپوپتوز می‌شود. سایتوکاین‌ها بصورت یک شبکه پیچیده هماهنگ عمل کرده و سنتز خود سایتوکاین‌ها و پذیرنده‌های سایتوکاینی دیگر را القاء یا سرکوب می‌کنند، همچنین شبکه سایتوکاینی بسیار انعطاف پذیر می‌باشد (۳۰). عملکرد سایتوکاین‌ها اغلب بصورت چند اثری ۱ و هم اثری ۲ است. چند اثری به معنای توانایی یک سایتوکاین به منظور اثر بر انواع مختلف سلول‌هاست.

این خصوصیت به سایتوکاین امکان اعمال اثرات بیولوژیک مختلف را می‌دهد، لیکن به شدت استفاده‌ی درمانی از آن را محدود می‌کند، چرا که تجویز یک سایتوکاین برای حصول یک اثر بالینی مطلوب ممکن است منجر به بروز بسیاری از اثرات جانبی ناخواسته گردد. هم اثری هم به معنای آن است که سایتوکاین‌های مختلف دارای آثار عملکردی مشابه هستند. به دلیل این هم اثری، بازدارنده‌های (آنتاگونیست‌های ۳) یک سایتوکاین واحد یا جهش در ژن یک سایتوکاین، ممکن است تأثیری بر عملکرد آن نداشته باشد. چون سایتوکاین‌های دیگر می‌توانند کمبود آن را جبران کنند (۳۳-۳۱).

سایتوکاین‌ها مشابه سایر هورمون‌های پلی‌پپتیدی با اتصال به گیرنده‌ی اختصاصی خود در سطح سلول هدف باعث شروع آثار بیولوژیک خود می‌شوند. سلول هدف ممکن است همان سلولی باشد که سایتوکاین را تولید کرده است که به آن اثر بر خود یا اتوکراین ۴ گفته می‌شود، یا از سلول‌های مجاور باشد که در این صورت اثر بر هدف مجاور یا پاراکراین ۵ نامیده می‌شود (شکل ۱-۲).

سایتوکاین‌هایی که فقط توسط لنفوسیت‌های فعال خصوصاً T تولید می‌شوند، لنفوکاین نام دارند. دسته‌ای از سایتوکاین‌ها را که سلول‌های بیگانه‌خوار تک‌هسته‌ای (مونوسیت، ماکروفاژ) تولید می‌کنند منوکاین می‌گویند. دسته‌ای از سایتوکاین‌ها، کموتاکتیک فاکتور هستند که به آن‌ها کموکاین می‌گویند. منوکاین‌ها در اثر تحریک سلول‌ها در ایمنی ذاتی یا غیر اختصاصی لنفوسیت‌ها تولید می‌شوند و قادراند در تنظیم رشد و دگرگونی یا تمایز جمعیت‌های مختلف لنفوسیتی موثر باشند و یا باعث فعال شدن و ایجاد پاسخ در سلول‌های سیستم ایمنی شوند. البته این طبقه بندی بسیار ساده است، دیگر طبقه‌بندی‌ها، براساس گروه‌بندی عملکردی و ساختمانی است (۳۴ و ۳۵).

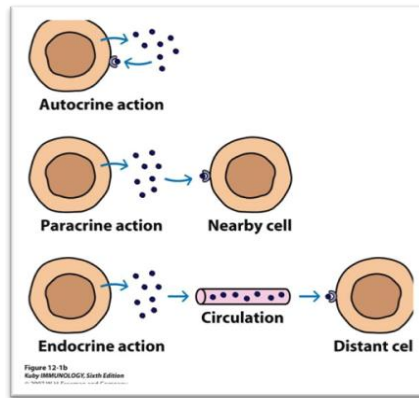
¹ Pleiotropic

² Redundant

³ Antagonist

⁴ Autocrine

⁵ Paracrine



شکل ۱-۱- شمایی از اعمال اتوکراین، پاراکراین و اندوکراین سایتوکاین‌ها (۲۵)

۱-۳-۳- طبقه‌بندی سایتوکاین‌ها

بطور کلی سایتوکاین را می‌توان سه گروه یا دسته بزرگ تقسیم کرد:

۱- سایتوکاین‌هایی که دارای خاصیت محرک‌های خونساز هستند، که در واقع توسط سلول‌های مغز استخوان، لکوسیت‌ها و سلول‌های دیگر تولید می‌شوند، که در رشد و تمایز لکوسیت‌ها نابالغ نقش اساسی دارند. در واقع در تبدیل Stem Cell به رده‌های مختلف سلولی و پیش‌سازهای آن‌ها موثرند، که شامل فاکتورهای محرک ایجاد کلنی (CSF) می‌باشد که شامل G-CSF و M-CSF (IL-7) می‌باشند.

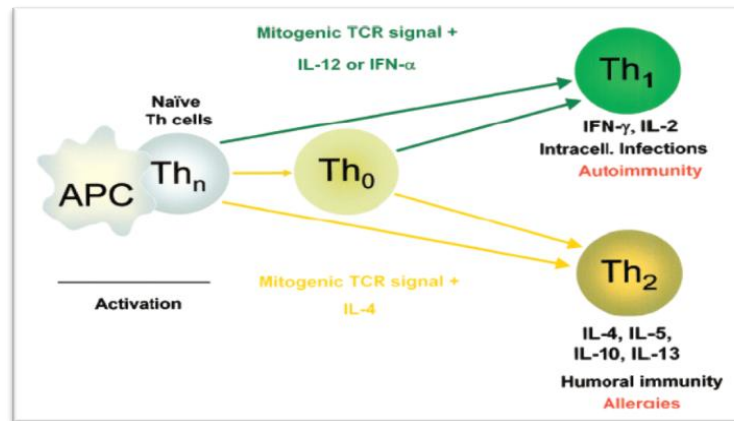
۲- اینترلوکین‌هایی هستند که از سلول‌های مختلف تولید شده، در تنظیم و فعال شدن سیستم ایمنی شرکت می‌کنند. که به عنوان واسطه و تنظیم کننده ایمنی ذاتی و ایمنی اختصاصی دخالت دارند، که تا کنون بیش از ۳۵ اینترلوکین شناسایی شده‌اند، که بصورت IL نشان داده می‌شوند.

۳- اینترفرون‌ها (IFN) می‌باشند، که معمولاً توسط سلول‌های آلوده به ویروس و لکوسیت‌ها ترشح شده و مانع از فعالیت و تکثیر ویروس‌ها گشته و در ایجاد پاسخ ایمنی نیز نقش دارند (۲۵).

در انسان پاسخ سیستم ایمنی در بارداری نرمال به سمت Th₂ گرایش پیدا می‌کند، در حالی که زنان با سابقه RSA به سمت Th₁ گرایش دارد. نقش Th₁ بصورت التهابی و Th₂ بصورت ضد التهابی بیان می‌شود. Th₁ در ایمنی سلولی و Th₂ در ایمنی هومورال دخیل است. یکی از عواملی که باعث سقط مکرر می‌شود نسبت زیاد Th₁ به Th₂ می‌باشد (۳۶). در افرادی که سقط‌های مکرر دارند نسبت به افرادی که حاملگی عادی دارند میزان IL-10، IL-6، IL-8، IL-11 کاهش پیدا می‌کند، در نتیجه سایتوکاین‌ها نقش مهمی را در بارداری موفق و ناموفق بازی می‌کنند (۳۷ و ۳۸).

۱-۳-۴- نقش سایتوکاین‌ها در تمایز سلول‌های Th1 و Th2 در پاسخ‌های ایمنی:

سلول‌های Th₁ و Th₂ از سلول‌های پیش‌ساز مشترکی مشتق می‌شوند، که توانایی تمایز به هر نوع Th را دارند. سایتوکاین‌ها مهمترین شاخص‌های تمایز Th می‌باشند. IL-12 که توسط ماکروفاژهای فعال تولید می‌گردند، باعث می‌شود که سلول‌های T اولیه (بکر)، (Naive T cells) متصل به آنتی‌ژن، به سلول‌های Th₁ تمایز یابند، که خود باعث وسعت دادن به پاسخ ماکروفاژها می‌شود. در عوض حضور IL-4 و IL-10 یک پاسخ ایمنی سلول‌های T دست نخورده را به سمت سلول‌های Th₂ تمایز می‌دهد. سایتوکاین‌های تولید شده به وسیله هر دو زیر مجموعه Th متقابلاً از توسعه همدیگر ممانعت می‌کنند (شکل ۱-۳۹) (۳۹-۴۱).



شکل ۱-۲- تمایز سلول‌های T کمکی (۳۲)

۱-۴-۱- اینترلوکین‌ها^۱

اینترلوکین‌ها عامل ارتباطی بین لکوسیت‌ها می‌باشند. در تعریف تحت لفظی، *inter* به معنی بین و *Leuk* از واژه‌ی لکوسیت و *in* به هر ماده‌ای که دارای فعالیت بیولوژیکی می‌باشد اطلاق می‌گردد.

این مواد جز سایتوکاین‌هایی هستند که هم بطور طبیعی در بدن ساخته می‌شوند و هم می‌توان آنها را در آزمایشگاه تولید نمود. انواع متعددی از اینترلوکین‌ها وجود دارد. این پروتئین‌ها با تنوع زیادی که دارند عملکردهایی خارج از سیستم ایمنی هم دارند. اینترلوکین‌های بکار گرفته شده در این مطالعه به شرح ذیل می‌باشند:

۱-۴-۱-۱- اینترلوکین یک (IL-1)

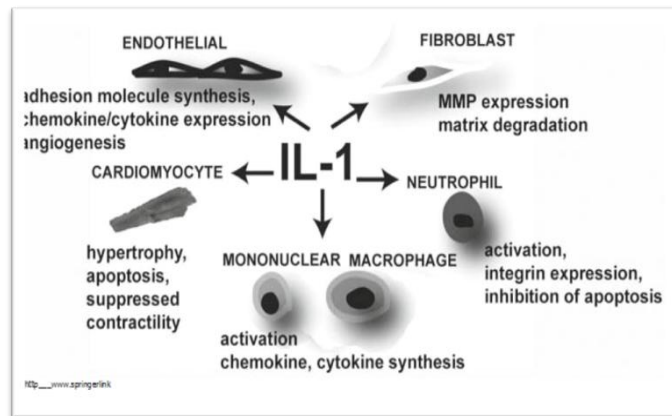
در سال ۱۹۷۲، از مایع رویی کشت مونسیت‌های خون محیطی انسان و موش، فاکتور میتوژنی برای تیموسیت‌ها جدا شد که آن را فاکتور فعال کننده لنفوسیت‌ها LAF^۲ نامیدند (۴۱ و ۴۰). در سال ۱۹۷۴ از کشت مونسیت‌های انسان، فاکتوری را جدا کردند که قادر بود بر روی سلول‌های طحال موش تاثیر کرده (از طریق وابسته به سلول‌های T)، باعث تولید آنتی بادی شود. این عامل را فاکتور فعال کننده سلول‌های B نامیدند (BAF)^۳. بررسی‌های بعدی نشان داد که LAF، BAF و عامل تبزای داخلی که توسط مونسیت‌ها ترشح می‌شود از نظر خواص بیوشیمیایی شبیه هم بوده و در حقیقت یک ماده شیمیایی می‌باشند. سرانجام در سال ۱۹۷۹ این فاکتور را اینترلوکین-۱ (IL-1) نامیدند (۴۲).

دو نوع از IL-1 به نام‌های IL-1 α و IL-1 β وجود دارند که محصول دو ژن مختلف می‌باشند (۴۳). ژن‌های سه سایتوکاین مرتبط به هم یعنی IL-1RA (۱۵۲ اسید آمینه)، IL-1 α (۱۵۹ اسید آمینه) و IL-1 β (۱۵۳ اسید آمینه) در نقشه کروموزومی انسان بر روی کروموزوم شماره ۲ در داخل کلاستر ژنی ۴۳۰ کیلوبازی 2q13-q21 قرار گرفته است (۴۴). بیشتر IL-1 در گردش خون IL-1 β است. اینترلوکین یک بتا با گیرنده IL-1beta واکنش می‌دهد. این اتصال بوسیله IL-1RA مهار می‌شود. آثار بیولوژیکی IL-1 وابسته به مقدار سایتوکاین تولید شده است. وقتی IL-1 در غلظت‌های کم ترشح می‌شود، بعنوان واسطه التهاب موضعی عمل می‌کند. IL-1 روی سلول‌های اندوتلیال اثر می‌کند بروز مولکول‌های سطحی مثل لیگاندهای اینتگرین را که واسطه چسبندگی لکوسیتی هستند، را افزایش می‌دهد. زمانی که IL-1 در مقادیر زیادتر تولید شود وارد جریان خون می‌شود و اعمال اندوکرینی انجام می‌دهد (شکل ۱-۴) (۳۷-۴۰).

¹ Interleukins, ILs

² Lymphocyte Activating Factor

³ B-cell Activating Factor



شکل ۱-۳- اثرات مختلف اینترلوکین یک (۴۱).

۱-۱-۴-۱- آنتاگونیست گیرنده اینترلوکین یک (IL-1RA)

فاگوسیت‌های تک هسته‌ای یک مهار کننده طبیعی IL-1 را تولید می‌کنند که از نظر ساختمانی شبیه سایتوکاین است و به همان رسپتور ها متصل می‌شود، ولی از نظر بیولوژیکی غیر فعال است، به همین دلیل بعنوان یک مهار کننده رقابتی IL-1 عمل می‌کند و به آن گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک (IL-1RA) گفته می‌شود. این مهار کننده می‌تواند بعنوان تنظیم کننده درون‌زای فعالیت IL-1 باشد (۴۶ و ۴۷).

آنتاگونیست گیرنده اینترلوکین یک، یک مولکول ضدالتهابی مهم می‌باشد که توسط ژن IL-1RN و معمولاً در ناحیه داخل ژنی کدگذاری می‌شود (۴۸ و ۴۹). این گیرنده در نقشه انسانی بر روی بازوی بزرگ کروموزوم ۲ در ناحیه ۳۶۰ کیلو بازی قرار گرفته است (۵۰).

آنتاگونیست گیرنده اینترلوکین یک (IL-1RN) به گیرنده IL-1 باند می‌شود و مانع از اتصال IL-1 α و IL-1 β می‌شود، در نتیجه فعالیت بیولوژیکی این دو سایتوکاین در ایمنی سلولی و پاسخ‌های التهابی خنثی می‌شود (۵۱ و ۵۲). مطالعات اخیر نشان داده است که پلی‌مورفیسم این ژن‌ها، بر روی تولید سایتوکاین‌ها و استعداد ابتلا به بیماری‌های التهابی، عفونی و یا بدخیم تاثیر گذار است. IL-1 β و IL-1 α بوسیله اندومتريوم و بلاستوسیت انسانی بیان می‌شوند و گیرنده IL-1 در آندومتر و تروفوبلاست‌ها یافت می‌شوند و همچنین در لانه‌گزینی و شدت و تهاجم سلول‌های تروفوبلاست تاثیر دارد (۵۴-۵۷). اینترلوکین یک نقش مهمی در لانه‌گزینی و تهاجم تروفوبلاستیک دارا می‌باشد. علاوه بر این، IL-1 یکی از القاء کننده‌های عمده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، تنظیم کننده کلیدی رگ‌زایی (آنژیوژنز) و فاکتور رشد ضروری برای رشد عادی جفت می‌باشد (۴ و ۵۷).

۱-۲-۴-۱- اینترلوکین ۶ (IL-6)

IL-6 پلی‌پپتیدی است با وزن مولکولی ۲۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ دالتون (بر حسب محتوی کربوهیدراتی و فسفوریلاسیون پروتینی) که در شکل فعال سایتوکاین، همو دایمری است که هر زیر واحد آن از ۴ دومن کروی به شکل مارپیچ آلفا، تشکیل یافته است. ژن کد کننده IL-6 در انسان بر روی کروموزوم 7p21 می‌باشد (۵۸-۶۰).

IL-6 یک سایتوکاین ترشحی می‌باشد که توسط بسیاری از سلول‌ها نظیر سلول‌های ایمنی لنفوسیت‌های T، B، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال سلول‌های اپیتلیال، adipocyte و منوسیت‌ها تولید می‌شود و دارای خواص بیولوژیک متعددی است که در طول بارداری بیان می‌شود (۶۱). این سایتوکاین اعمال مهمی را در خونسازی و پاسخ‌های ایمنی و فاز حاد ایفاء می‌کند. مشخص

¹ IL-Receptor antagonist

شده که تولید IL-6 با پلی‌مورفیسم در پروموتور ژن سایتوکاین مرتبط است. در زنان بامشکل سقط که، کاهش غلظت IL-6 در پلاسما مشاهده شده است (۶۱-۶۳).

۱-۴-۳-اینترلوکین ۱۰^۱

اینترلوکین ده که ابتدا به آن فاکتور ممانعت کننده تولید سایتوکاین‌ها می‌گفتند، یک پلی‌پپتید همو دایمر حساس به حرارت با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون است که بوسیله سلولهای Th2 و ماکروفاژهای فعال، ترشح و از تولید اغلب یا همه سایتوکاین‌هایی که توسط سلولهای Th1 ساخته می‌شود، جلوگیری می‌کند. و یکی از سایتوکاین‌های مهم چند عملکردی است که جزء کلیدی بسیاری از جوانب پاسخ ایمنی می‌باشد (۶۴).

این سایتوکاین، یک لنفوکاین پلی‌پروتوپیک می‌باشد که نقش مهمی در القاء و حفظ آنزیم ایفا می‌کند. این سایتوکاین به جهت توانایی‌اش در مهار و فعال سازی عملکردهای اجرایی سلولهای T، منوسیت‌ها و ماکروفاژها شناخته شده است (۶۴). در واقع تولید این سایتوکاین توسط عناصر پلی‌مورفیک متعددی در ناحیه ۵ ژن سایتوکاین واقع در لوکوس (1q31-q32) کنترل می‌شود که شامل آللهایی در دو منطقه میکروستلاستی و تعدادی SNP در منطقه دیستال و پروگزیمال پروموتور می‌باشند (۶۱ و ۶۵).

۱-۴-۴-اینترلوکین ۱۳ (IL-13)

اینترلوکین-۱۳ که قبلاً به آن P-600 می‌گفتند. توسط لنفوسیت‌های T تولید می‌شود (۶۶). این لنفوکاین باعث رشد و تمایز لنفوسیت‌های B شده، و همچنین موجب تولید Ige توسط این گروه از لنفوسیت‌ها می‌شود. علاوه بر این IL-13 از تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی توسط مونوسیت‌ها و ماکروفاژها جلوگیری می‌کند (۶۷). IL-13 یک پروتئین است که در انسان توسط ژن IL-13 کد گذاری شده است. IL-13 توسط بسیاری از انواع سلول‌های ترشح می‌شود، اما بیشتر توسط سایتوکاین‌ها بخصوص سلول T کمکی نوع ۲ (Th2) تولید می‌شود (۶۸).

اینترلوکین‌های ۴، ۱۰ و ۱۳ سایتوکاین‌های مهم ضدالتهابی هستند. جلوگیری از التهاب پاتولوژیک در سطوح مخاطی، تا حدودی به حضور این سایتوکاین‌ها مربوط می‌شود. یکی از منابع مهم این سایتوکاین‌ها ماست سل‌های مخاطی‌اند. IL-13 بر روی مونوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های B اثری مشابه IL-4 دارد. اما بر روی سلول‌های T بی‌اثر است. IL-13 باعث ظهور برخی مولکول‌های چسبنده بر روی سلول‌های اندوتلیال می‌شود (۶۹ و ۷۰).

۱-۴-۵-اینترلوکین ۱۷ (IL-17)

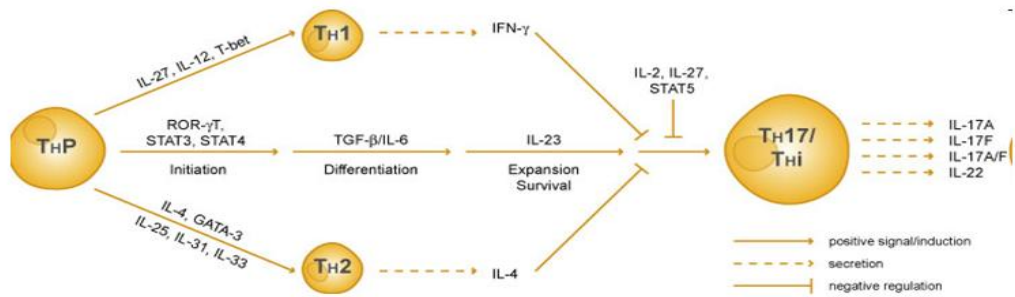
Th 17 به عنوان زیر مجموعه ای از سلول‌های T کمکی می‌باشد، همچنین نقش مهمی را در فرایند التهاب، تولید اینترلوکین ۱۷، بیماری‌های اتوایمیون مانند MS و بافت‌هایی که جراحی در آن‌ها صورت پذیرفته ایفا می‌نماید. IL-17 مولکول همو دایمری است که به دو شکل گلیکوزیله و غیر گلیکوزیله دیده می‌شود و احتمالاً عملکرد آن توسط فرم گلیکوزیله آن انجام می‌پذیرد (۷۱ و ۷۲).

اینترلوکین ۱۷ به عنوان یک عضو عملکردی از سایتوکاین‌های پیش‌التهابی به تهاجم پاتوژن‌های خارج سلولی پاسخ داده و باعث تخریب ماتریکس سلولی پاتوژن می‌شود.

اینترلوکین ۱۷ به صورت سینرژیسیم (هم افزایی) با TNF و IL-1 عمل می‌کند (۷۳). ژن IL-17 انسان بر روی بازوی بلند کروموزوم ۲ قرار دارد.

IL-17 بر روی سلول‌های استرومایی مغز استخوان تاثیر کرده و آن‌ها را مجبور به تولید برخی سایتوکاین‌های دیگر مانند IL-6 و G-CSF می‌کند که این عمل منجر به تولید نوتروفیل‌ها می‌شود (۷۴). خانواده سایتوکاین IL-17 دارای شش عضو می‌باشد، شامل: IL-17 A، IL-17 B، IL-17 C، IL-17 D، IL-17 E، IL-17 F و IL-25 (شکل ۵-۱). در این مطالعه به بررسی IL-17 A، موتاسیون 197 G/A پرداخته‌ایم.

¹ Interlukine-10 (IL-10)



Bettelli et al., Nature 2008

شکل ۱-۴ - مراحل تمایز اینترلوکین ۱۷ از Th 17 (75).

۵-۱- مطالعات انجام گرفته بر روی نقش پلی مورفیسم‌های سایتوکاین‌ها در سقط مکرر

تا به امروز مطالعات زیادی در رابطه با عملکرد سایتوکاین‌ها در بخش‌های مختلف بدن و بیماری‌های انسانی صورت گرفته است. همانطور که ذکر شد اینترلوکین‌ها در سلول‌های مختلفی بیان می‌شوند، به همین دلیل مطالعات بسیار زیادی بر بیماری‌های مختلف انجام شده است، مانند سیستم تنفسی، سیستم گوارشی، کلیه، سلول‌های عروق عضله صاف، بیماری‌های التهابی، سرطان‌ها و سقط مکرر و.. (۷۶-۷۸).

بررسی‌ها نشان دادند که این پلی مورفیسم‌ها بصورت، تک نوکلئوتیدی (SNP) یا دی نوکلئوتیدی (microsatellite) هستند (۱۰۴). سایتوکاین‌هایی که از Th1 و Th2 مشتق می‌شوند بر روی عملکرد بارداری تاثیر گذار می‌باشند (۷۹).

Hill و همکاران در سال میلادی ۱۹۹۵ به بررسی پلی مورفیسم در سایتوکاین‌ها پرداختند و به این نتیجه رسیدند که، پلی-مورفیسم‌ها بر سطح تولید سایتوکاین‌ها تاثیر گذار می‌باشند (۳۹).

Cartwright و همکارانش در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۱ بر روی پلی مورفیسم ژن سایتوکاین و ترشح پروتئین در پیوند مرتبط به کلیه‌ها کار کردند و نشان دادند که پلی مورفیسم ژن‌های سایتوکاینی در ارتباط با استعداد برخی از بیماری‌های عفونی و التهابی می‌باشد.

در سال ۱۹۹۰ Hant و همکاران نشان داده‌اند که IL-4، IL-10 و IL-13 بر توسعه و رشد جنین و تشکیل جفت نقش دارند. مطالعه‌ای توسط Makhseed در سال ۲۰۰۱ پروفایل سایتوکاین‌های مترشحه از Th1 و Th2 بر روی نتایج بارداری موفق و سقط انجام شد. افراد این مطالعه شامل: ۵۴ خانم با داشتن سه بارداری موفق، ۳۹ خانم دارای سقط که قبل از سقط یک بارداری موفق را تجربه کرده بودند و ۲۴ خانم که دارای سقط بودند بدون سابقه بارداری موفق. مشابه این بررسی نیز در سال ۲۰۰۰ توسط Raghupathy و همکاران انجام شد.

Hefler و گروه تحقیقاتی آن در سال ۲۰۰۲ بر روی پلی مورفیسم ژن IL-1β در موقعیت ۵۱۱- مطالعه داشته‌اند که گروه بیمار ۱۳۰ از خانم‌هایی، که دارای سقط مکرر ناشناخته بودند و گروه نرمال هم ۶۷ از خانم‌هایی که دارای بارداری موفق و نرمال بودند.

Hutchinson و همکاران وی نشان دادند که پلی مورفیسم‌های واقع در توالی موجود در مناطق پروموتور ژن ممکن است فعال شدن نسخه برداری را تحت تاثیر قرار داده و موجب تغییر در مقدار تولید سایتوکاین‌ها گردد.

Jin و همکارانش در سال ۲۰۰۳ بر روی پلی مورفیسم در ایمونو پزشکی کار کردند و بیان داشتند که توازن Th در بسیاری از بیماری‌های التهابی و عفونت‌ها موثر است.

Unfried و همکارانش در سال ۲۰۰۳ پلی‌مورفیسم ژن IL-6 با سقط مکرر ناشناخته را بررسی کردند. در همین سال Daher و همکارانش بر روی ارتباط پلی‌مورفیسم ژن سایتوکاین‌ها و سقط مکرر مطالعه داشتند، این مطالعه بر روی پلی‌مورفیسم‌های IL-10، IL-6 و TNF- α در برزیل انجام شد.

در سال ۲۰۰۴ میلادی Prigoshin و همکارانش پلی‌مورفیسم‌های ژن سایتوکاین‌ها و سقط مکرر ناشناخته مورد بررسی قرار دادند. این گروه پلی‌مورفیسم‌های IL-6، IL-10، TGF- β ، IFN- γ و TNF- α را مطالعه کردند (۳۷).

Pandey و همکاران در سال ۲۰۰۵ برای جدید کردن عوامل دخیل بر سقط‌های خودبخودی مکرر مطالعاتی را انجام دادند. قادری و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر روی ارتباط پلی‌مورفیسم TGF- β 1 با سقط مکرر ناشناخته کار کردند این مطالعه با استفاده از روش RFLP انجام شد. گروه کنترل ۱۱۰ خانم با بارداری موفق و ۱۱۱ خانم با داشتن سقط مکرر افراد بیمار در این مطالعه بودند.

در سال ۲۰۰۶ کمالی و همکاران با بررسی پلی‌مورفیسم‌های ژن سایتوکاین و سقط مکرر در جمعیت ایرانی به بررسی پلی‌مورفیسم IL-4، IL-10 و TNF- α پرداختند. این مطالعه شامل ۱۳۹ خانم با سقط مکرر گروه بیمار و ۱۴۳ خانم با بارداری نرمال گروه کنترل بود.

در سال ۲۰۰۶، Zammiti و همکارانش مطالعه‌ای بر روی موتاسیون‌های پروموتور اینترلوکین ده انجام دادند که در این بررسی ۲۰۰ خانم با سابقه داشتن دو بارداری موفق به عنوان گروه کنترل و ۳۵۰ خانم با سه سقط مکرر به عنوان گروه بیمار انتخاب شدند. در نتیجه ارتباط و اهمیت توازن بین Th1 و Th2 را برای بارداری موفق بررسی کردند.

Szekeres و همکارانش در سال ۲۰۰۸ بر روی هورمون درمانی پروژسترون در سقط مکرر مطالعاتی داشته و مطرح نمودند که هورمون‌ها بر تولید Th1 و Th2 موثر می‌باشند، به عنوان مثال پروژسترون قادر است تولید Th2 (فعالیت ضد التهابی) را القاء کند و همچنین relaxin یک هورمون پلی‌پپتیدی است و عمدتاً بوسیله جسم زرد و decidua در طول بارداری تولید می‌شود، در سلول‌ها T، تولید IFN- λ را افزایش می‌دهد. 17- β استرادیول و هورمون محرک گناد انسانی (HCG) هیچ تاثیری بر تمایز و تبدیل سلول‌های T به Th1 و Th2 ندارند.

از طرفی با توجه به مطالعات گذشته مشاهده نمودیم که تمامی مراحل باروری مملو از مثال‌هایی می‌باشد که نشان دهنده‌ی اهمیت همکاری تنگاتنگ سیستم ایمنی با تولید مثل است و ریشه‌ی بسیاری از ناباروری‌ها را می‌توان در عدم همکاری بین سیستم ایمنی و سیستم تولید مثل مشاهده کرد.



فصل دوم مواد و روش ها

Archive of SID

شرح آزمایش‌ها و کارهای اجرائی:

جهت تعیین پلی‌مورفیسم سایتوکاین‌ها در سندرم سقط مکرر مراحل زیر به ترتیب انجام شد:

۱. نمونه‌گیری از بیماران و زنان نرمال .
۲. جداکردن PBMC.
۳. تخلیص DNA.
۴. PCR و RFLP .
۵. تحلیل آماری.

۱-۲ جمعیت مورد مطالعه و نحوه نمونه‌گیری

این مطالعه از نوع مورد - شاهدهی بوده و بطور کلی ۳۰۰ خانم وارد مطالعه شدند در طی سال ۱۳۸۹ در مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر این سینا در مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. به منظور نمونه‌گیری خون و انجام طرح، از کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی پژوهشگاه این سینا مجوز لازم اخذ شد و تمام افراد مورد مطالعه رضایتنامه تدوین شده را آگاهانه امضا نمودند.

از ۳۰۰ نمونه دریافت شده در این مطالعه، ۲۰۰ نمونه از بیماران مبتلا به سقط مکرر که دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند، انتخاب شد. این بیماران از مراجعین به کلینیک سقط مکرر نداشتند (معیارهای خروج از مطالعه) انتخاب شدند و در گروه بیماران قرار گرفتند. همچنین ۱۰۰ نمونه کنترل از افراد مراجعه کننده به کلینیک تعیین جنسیت مرکز درمان این سینا انتخاب شدند. این افراد دارای بیماری زمینه‌ای و یا مشکلاتی حین بارداری نبوده و حداقل دارای دو فرزند سالم بودند. نمونه‌های گروه کنترل و بیمار از لحاظ یافته‌های دموگرافیک از جمله سن، وزن و با هم Match نشده و به ترتیب از بیماران مراجعه کننده به این دو کلینیک که دارای معیارهای ورود به مطالعه بودند، انتخاب شدند. چون افراد مورد بررسی شده در این مطالعه، از دو گروه مختلف انتخاب شده‌اند. بدیهی است که در بعضی معیارهای دموگرافیک متفاوت می‌باشند. به طور مثال بیماران مبتلا به سقط مکرر در سنین بالاتر اقدام به بارداری می‌کنند و بعد از چندین سقط، بلافاصله جهت درمان مراجعه می‌کنند. در حالی که افرادی که برای تعیین جنسیت به کلینیک مربوطه مراجعه می‌کنند، در سنین کمتر، اولین بارداری را تجربه کرده و بعد از چندین بارداری موفق و تولید نوزادانی از یک جنسیت در سنین بالاتر برای تولد نوزاد جدید با جنسیت مخالف مراجعه می‌کنند. لذا این دو گروه قابلیت matching ندارند. لازم به توضیح است که با افزایش سن مادر، مشکلات مرتبط با بارداری از جمله سقط مکرر، افزایش می‌یابد. به دلیل اینکه محتوای ژنتیک و DNA هر فرد، در طول عمر یکسان می‌باشد، لذا تغییر سن باعث تغییرات در ژنتیک فرد نمی‌گردد و عامل سن یک عامل مداخله کننده در بررسی‌هایی گوناگون DNA از جمله بررسی پلی‌مورفیسم‌های مختلف با روش RFLP-PCR نمی‌باشد.

۱-۱-۲ معیار ورود زنان به مطالعه شامل:

- ۱- سن، ۲۵-۴۵ سال
- ۲- گروه بیمار، ۲۰۰ نفر از بین زنان مبتلا به سندرم سقط مکرر خودبخودی (داشتن سابقه حداقل سه یا بیش از سه سقط)
- ۳- گروه کنترل، ۱۰۰ خانم بدون سابقه سقط و دارای حداقل دو باروری موفق

۲-۱-۲ معیار خروج زنان از مطالعه شامل:

- ۱- وجود ناهنجاری‌های آناتومیک
- ۲- اختلالات هورمونی
- ۳- بیماری التهاب لگنی

۲-۲-۲- استخراج DNA

در این تحقیق، بعد از نمونه‌گیری از روش Salting out برای استخراج DNA استفاده شد.

۲-۲-۲-۱- مواد، محلول‌های لازم برای استخراج DNA :

- کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl، M: ۵۸/۴۴، Merck، Germany)
- Na₂ EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₂·H₂O, Plus one, Sweden, No 17-1324-01)
- Tris-HCl ((CH₂OH)₃ CNH₂, HCl, USB, USA, NO 22676)
- اسید کلریدریک (HCl, Mojallali Chemical Laboratories, Iran)
- آب مقطر دوبار تقطیر استریل
- هیدروکسید سدیم (NaOH, Merck, Germany, No 106482)
- ایزوپروپانول (CH₃CH(OH)CH₃، M: ۶۰/۱۰، Merck, Germany)
- SDS (C₁₂H₂₅OSO₃Na, Plus one, Sweden, No 17-1313-01)
- پروتئیناز K (QIAGEN, USA, No 19131)
- اتانول ۹۶٪ (CH₃CHOH، M: ۴۶/۰۷، Merck, Germany)
- میکروتیوب ۱/۵ ml (Trefflab, Germany)
- دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار (Eppendorf, Germany)
- سمپلر متغیر (۱۰۰-۱۰ μl و ۱۰-۰/۵ μl) (Eppendorf, Germany)
- اسپکتروفتومتر (PicoDrop, England)

۲-۲-۲-۲- تهیه محلول‌های مورد نیاز :

- بافر TES [Tris-EDTA-Salt, pH= 7.5-8]
- برای تهیه بافر TES ابتدا محلول‌های زیر تهیه شد:
 - EDTA (0.5M, pH= 8)
 - ۱۸۶/۱۲ گرم از پودر EDTA داخل ۱ لیتر آب مقطر استریل حل کرده و pH محلول با NaOH روی عدد ۸ تنظیم شد (لازم به ذکر است که قبل از به حجم رساندن، pH روی عدد ۸ تنظیم شد زیرا این pH برای حل شدن EDTA ضرورت دارد).
 - Tris-HCl (1M, pH= 7.4-8)
 - ۱۲۱/۱۴ گرم از Tris-HCl داخل آب مقطر استریل حل کرده و pH محلول با HCl تنظیم گردید.
- تهیه TES بصورت زیر می‌باشد:
 - ۳۰ ml از ۵M NaCl، ۲۰ ml از ۰.۵M EDTA و ۱۰ ml از ۱M Tris-HCl مخلوط کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۱۰۰ ml رسانده شد. pH محلول با HCl (1M) بر روی عدد ۸-۷/۴ تنظیم گردید.
 - بافر TE (1X, pH=8):
 - مقدار ۱۰ ml از ۱M Tris-HCl را با ۲ ml از ۰.۵M EDTA مخلوط کرده و حجم نهایی محلول با آب مقطر استریل به ۱ لیتر رسانده شد.

۲-۲-۳- روش استخراج

-مراحل استخراج به صورت زیر انجام شد:

- ۱- ۵ میلی‌لیتر خون از هر فرد گرفته شده و به فالکون حاوی ماده ضد انعقاد EDTA انتقال داده شد.

- ۲- خون تا فراهم شدن مقدمات سرد نگه داشته شد (استخراج در ۲۴ ساعت اول توصیه می‌شود).
- ۳- سانتریفیوژ خون با دور ۱۴۰۰g و به مدت ۵ دقیقه.
- ۴- پلاسما (مایع رویی) ایجاد شده را دور ریخته لایه گلبول‌های سفید (Buffy coat) و گلبول‌های قرمز باقی می‌ماند.
- ۵- اضافه کردن DDW به حجم خود خون به منظور لیز RBCها.
- ۶- سانتریفیوژ مجدد با دور ۱۴۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه.
- ۷- مایع رویی را دور ریخته و روی رسوب به مقدار ۶-۵ میلی لیتر آب مقطر سرد اضافه گردید و خوب تکان داده شد (ور تکس).
- ۸- سانتریفیوژ با دور ۱۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه.
- ۹- مراحل ۷ و ۸ تکرار شد تا رسوب صورتی کم رنگ ظاهر گردد.
- ۱۰- به رسوب فوق مقدار $300 \mu\text{l}$ از بافر TES اضافه گردید، خوب تکان داده شد تا کاملاً حل شود، سپس به آن $250 \mu\text{l}$ از SDS ۱۰٪ و $8 \mu\text{l}$ از پروتیناز K (10 mg/ml) اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد.
- ۱۱- بن ماری به مدت ۲ ساعت 55°C یا ۲۴ ساعت 37°C .
- ۱۲- اضافه کردن $2000 \mu\text{l}$ کلریدسدیم ۵ مولار به لوله آزمایش فوق اضافه گردید و به آرامی تکان داده شد و سپس با دور 14000g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، محلول رویی به لوله‌ی جدیدی منتقل شد.
- ۱۳- مقدار 4 ml ایزوپروپانول به هر لوله اضافه گردید و محلول به آرامی تکان داده شد تا کلاف DNA ظاهر گردد.
- ۱۴- مشاهده کلاف DNA و انتقال آن به همراه کمی از محلول به یک میکروتیوب استریل منتقل گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور 14000g سانتریفیوژ شد.
- ۱۵- مایع رویی را دور ریخته و روی رسوب (DNA Pellet) حدود $500-200 \mu\text{l}$ اتانول ۷۰٪ اضافه، به مدت ۱ دقیقه با دور 14000g سانتریفیوژ شد.
- ۱۶- مایع رویی دور ریخته و میکروتیوب تا تبخیر مایع باقیمانده در محیط آزمایشگاه نگهداشته شد، سپس به آن بافر TE یا آب مقطر دو بار تقطیر استریل اضافه شد (حجم بافر TE یا آب مقطر بستگی به مقدار DNA دارد و از $10 \mu\text{l}$ تا $200 \mu\text{l}$ متغیر می‌باشد) DNA های استخراج شده تا زمان انجام PCR در دمای 20°C - نگهداری شدند.

۲-۳- الکتروفورز روی ژل آگاروز:

اصول: به طور کلی حرکت ذرات باردار تحت تأثیر میدان الکتریکی را الکتروفورز می‌نامند. در این فرآیند خصوصیات فیزیکوشیمیایی مولکول‌ها (اندازه، شکل و میزان بار الکتریکی)، شرایط محیطی (قدرت یونی، pH و درجه حرارت) و فاکتورهای الکتریکی (اختلاف پتانسیل و شدت جریان) موثر هستند. اسیدهای نوکلئیک در $\text{pH}=8$ بار منفی دارند و تحت تأثیر میدان الکتریکی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. جداسازی مولکول‌های اسید نوکلئیک در محیط پایه ژل آگاروز بر اساس تفاوت وزن مولکولی از یکدیگر جدا می‌شوند.

محصولات PCR بوسیله الکتروفورز روی ژل آگاروز، در حضور شاهد مناسب تفکیک شده و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط تاباندن اشعه ماوراء بنفش به ژل و انعکاس درخشش فلئورسانس قابل مشاهده می‌گردند.

۲-۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز:

- Tris-base (Plus one, Sweden) $(\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3)$
- اسید استیک گلاسیال (Merck, Germany) (CH_3COOH)
- EDTA (Plus one, Sweden, No 17-1324-01) $(\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\text{H}_2\text{O})$
- برموفنل بلو (Merck, Germany, No 8122) $(\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S})$
- گلیسرول (Merck, Germany, No 4091) $(\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3)$

- آگاروز (USB, USA, No 32802)
- تانک الکتروفورز افقی (BioRad, USA)
- اتیدیوم بروماید (10 mg/ml, Roche, Germany)
- مارکر DNA 100 bp (Roche, Germany)
- دستگاه UV Transilluminator (UVP, USA)
- Casting tray (BioRad, USA)
- ترازو

۲-۳-۲- تهیه بافر (50x) TAE (Running Buffer):

برای تهیه این محلول، ۱۲۱ گرم از Tris base و ۲۸/۵۵ ml (یا ۲۸/۵ ml) اسید استیک گلاسیال با ۵۰ میلی‌لیتر محلول EDTA (0.5 M) مخلوط شده و به حجم ۵۰۰ ml رسانده می‌شود.

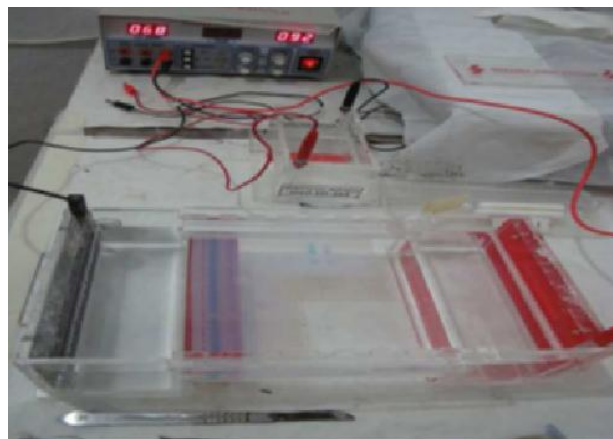
۲-۴-۲- آنالیز کمی و کیفی DNA

به منظور تعیین صحت استخراج، تمامی DNA های استخراج شده مورد آنالیز کیفی و کمی قرار گرفتند. در واقع ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده و تعیین غلظت و خلوص آن، نشان داد که کیفیت نمونه بدست آمده با روش‌های ذکر شده، جهت آزمایش PCR مناسب است. در برخی موارد ناخالصی‌هایی از مراحل مختلف، DNA را همراهی می‌کند که می‌توانند در روش‌های مولکولی دخالت کرده و این آزمایشات را با مشکل مواجه کنند.

۲-۴-۱- آنالیز کیفی DNA

مواد مورد نیاز: پودر آگاروز، بافر TAE (1X)، دستگاه الکتروفورز افقی همراه با لوازم جانبی برای ریختن ژل، اتیدیوم برماید 10 mg/ml و دستگاه ژل داکيومنت.

پس از استخراج DNA، با توجه به تعداد نمونه‌های استخراج شده، کاست‌های ژل آگارز ۱٪ آماده شد تا DNA های استخراج شده مورد آنالیز کیفی قرار بگیرند. نحوه کار به این صورت بود که برای کاست ۷ تایی ۰/۳ گرم آگارز در ۳۰ ml بافر TAE 1x و برای کاست ۲۱ تایی ۱/۸ گرم آگارز در ۱۸۰ ml بافر TAE 1x با استفاده از حرارت یا در ماکروفر قرار داده و حل کرده و پس از افزودن مقدار مناسب اتیدیوم برماید (مقدار ۲ µl برای حجم ۱۸۰ ml بافر TAE 1x) در کاست ریخته شد. و پس از سفت شدن، ژل برای الکتروفورز مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز برای همه نمونه‌ها انجام شد (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲- الکتروفورز برای تعیین آنالیز کیفی DNA

۲-۵-۲- آنالیز کمی DNA

وسایل مورد نیاز: دستگاه UV اسپکترومتر (NANO DROP, USA)، آب مقطر استریل، مجموعه کامل سمپلر به همراه سر سمپلر استریل، میکروتیوپ ۰/۵ استریل.
مراحل انجام کار:

۱- کالیبر دستگاه اسپکتروفوتومتر به وسیله آب دیونیزه دوبار تقطیر به حجم 1 میکرولیتر در ۲۶۰ nm و ۲۸۰ nm.
۲- خواندن OD260 و OD280 برای 1 میکرولیتر از نمونه DNA که با آب دیونیزه دوبار تقطیر به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رسیده است.

۳- استفاده از آب دیونیزه دوبار تقطیر به عنوان بلانک.

۴- محاسبه نسبت OD260/OD280.

۵- محاسبه غلظت DNA.

$$\text{DNA concentration (}\mu\text{g/ml)} = \frac{\text{OD}_{260} * 100 (\text{dilution factor}) * 50 \mu\text{g/ml}}{1000}$$

۲-۵- ژنوتایپ کردن نمونه‌ها (ژنوتایپینگ)

۲-۵-۱- انتخاب پرایمرهای مناسب برای هر موتاسیون

۲-۵-۱-۱- طراحی آغازگر

قواعد مشخصی برای اینکه بتوان با اطمینان یک جفت پرایمر موثر را انتخاب کرد، وجود ندارد. در حال حاضر پرایمر بیش از هر عامل دیگری عامل موفقیت یا شکست در یک واکنش تکثیری است. بعضی قواعد راهنمایی‌های مفیدی را در مورد طراحی آغازگر می‌کنند که ذیلاً به آنها اشاره شده است.

۱- طول متوسط هر پرایمر بین ۱۸-۳۰ جفت باز مناسب است. با طول پرایمر، کوچک اتصال غیراختصاصی افزایش یافته و با طول پرایمر بزرگتر، سرعت هیبریداسیون کاهش می‌یابد.

۲- مقدار G-C دو پرایمر Forward و Reverse با هم مشابه بوده و حداکثر ۵۰-۶۰ درصد باشد.

۳- آغازگرها را باید از نظر مکمل بودن با هم کنترل شوند^۱ تا از تشکیل پرایمر دایمر جلوگیری می‌شود.

پرایمر دایمر یک تکثیر مصنوعی است که اغلب در محصول PCR مشاهده می‌شود و عبارتست از یک قطعه‌ی دو رشته‌ای که طول آن تقریباً به مجموع دو پرایمر نزدیک است و هنگامی مشاهده می‌شود که یک پرایمر توسط آنزیم پلی‌مراز به روی پرایمر دیگر گسترش یابد مکانیزم واقعی که چگونه پرایمر دایمر تشکیل می‌شود بدرستی مشخص نیست. پرایمرها با انتهای مکمل^۳ مستعد تشکیل دایمر هستند. ضعف در آنزیم Taq باعث پلیمریزاسیون مستقیم الگوی غیر هدف می‌شود. در هر حال چنانچه پرایمر دایمر بعنوان مانعی مشاهده شود، می‌توان آن را تا حدودی با غلظت حداقل پرایمر و آنزیم کاهش داد.

۴- در انتهای^۳ پرایمر باید حداقل C یا G قرار گیرد. در توالی‌هایی پرایمرهایی که انتهای^۳ آنها غنی از G+C می‌باشد احتمال اتصال اشتباهی افزایش می‌یابد.

۵- باید تا حد امکان از توالی‌های پالیندرومیک داخل پرایمرها جلوگیری کرد.

۶- نسبت چهار نوکلئوتید در آغازگر حتی المقدور یکسان باشد.

۷- آغازگر به توالی تکرار شونده ختم نشود.

۸- دمای Tm دوپرایمر آغازگر^۲ نزدیک هم باشد.

¹ Blast

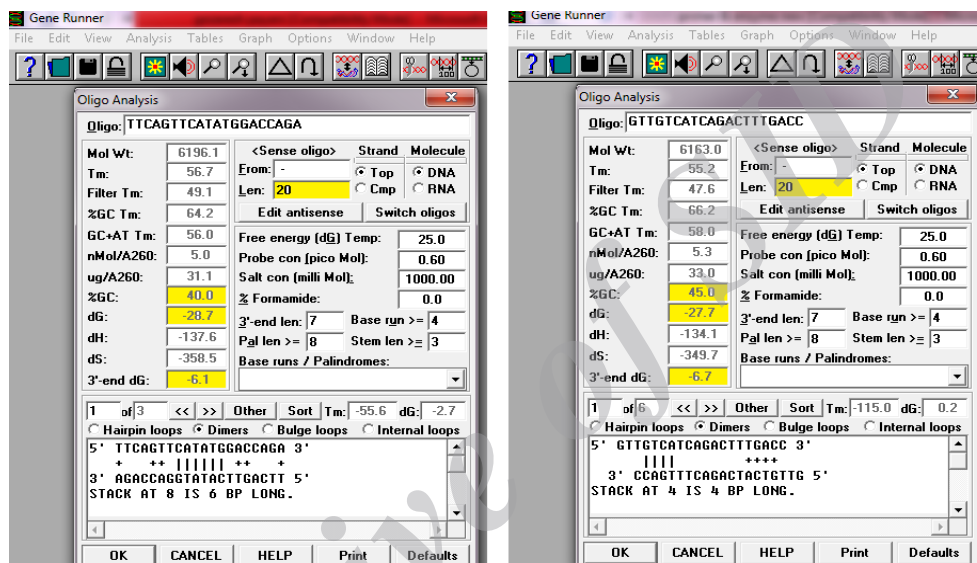
² Forward and Reverse

۹- حد مجاز دمای اتصال پرایمر طراحی شده باید بین ۶۵-۵۵ باشد. دمای تکثیر ایده‌آل ۶۲-۷۲ می‌باشد.

۱۰- درجه حرارتی که پرایمر به DNA الگو متصل می‌شود، به طول آغازگر و مقدار GC آن بستگی دارد

با توجه به مطالب بالا، برای هر موتاسیون، پرایمر مناسب جهت ژنوتایپ کردن هر نمونه DNA از طریق واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس^۱ و چند شکلی در طول قطعات محدود^۲ از منابع معتبر انتخاب شد و این پرایمرهای انتخاب شده بوسیله نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی و Gene Runner مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این بررسی با Blast کردن پرایمرها، پرایمرها از لحاظ شناسایی صحیح موقعیت و همچنین عدم Miss Match بررسی می‌شود.

در بررسی با نرم‌افزار Gene Runner، خصوصیات فیزیکی پرایمرها مورد بررسی قرار می‌گیرد شکل ۲-۲.



شکل ۲-۲ - با این نرم‌افزار درصد گوانین-سیتوزین (%GC)، dG برای دایمر، Hairpin loops و Internal loops بررسی می‌شود.

۲-۵-۲- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس^۳

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس به منظور ایجاد مقادیر نامحدود از یک توالی مورد نظر می‌باشد. PCR می‌تواند یک مولکول منفرد از DNA را چندین بلیون بار در مدت چند ساعت افزایش دهد و این روش هم در تشخیص مولکولی و هم در آنالیز مولکولی بیماری‌های ژنتیکی انقلابی به وجود آورده است (تصویر ۲،۲).

پس از انتخاب جفت پرایمر مناسب به منظور ژنوتایپ کردن هر نمونه برای هر کدام از پلی‌مورفیس‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس به منظور تکثیر قطعه ژن حاوی ناحیه موتاسیون برای هر جفت پرایمر بهینه‌سازی می‌شود. صحت انجام PCR با انجام الکتروفورس برای محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ پس از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید زیر نور UV تایید شد.

¹ Polymerase Chain Reactions(PCR)

² Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)

³ Polymerase Chain Reactions PCR

۲-۶- مواد و تهیه ژل آگارز

۲-۶-۱- مواد و محلول‌های لازم برای الکتروفورز ژل آگارز

۱. پودر آگارز
۲. محلول TAE (Tris base Acetic acid Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)
۳. محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر (غلظت اتیدیوم بروماید: یک میکروگرم در میکرولیتر)
۴. مارکر وزن مولکولی DNA متناسب با طول قطعه محصول PCR

۲-۶-۲- نحوه تهیه ژل آگارز ۱/۵٪

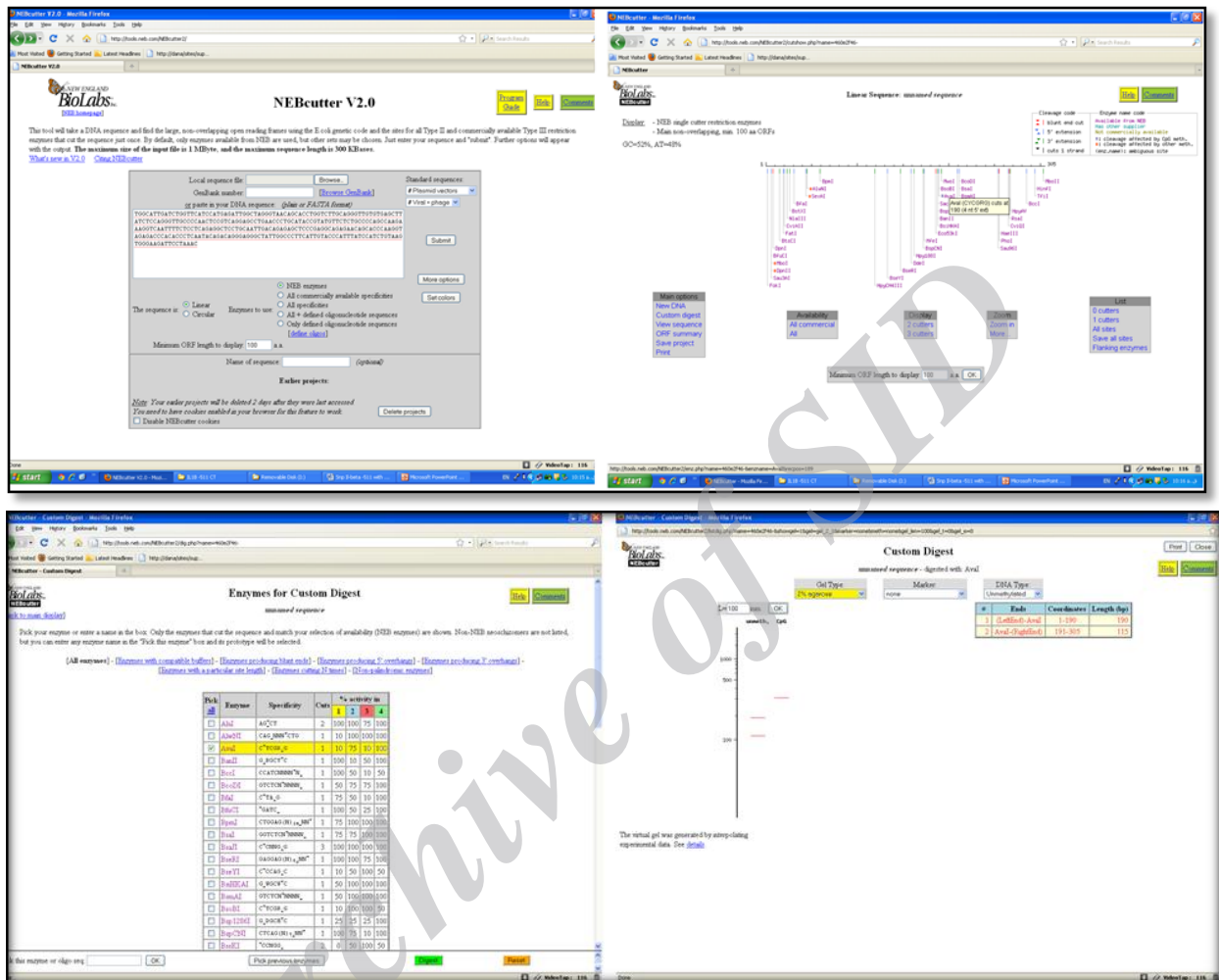
حجم ژل آگارز، با توجه به اندازه تانک الکتروفورز تعیین می‌شود. برای یک تانک متوسط، تهیه حجم ۷۰ سی‌سی ژل آگارز، ۱/۰۵ گرم از پودر آگارز را با ۷۰ سی‌سی محلول TAE (IX) در ارلنی مخلوط و پس از حرارت دادن و حل کامل پودر آگارز در محلول، پس از کمی سرد شدن، ۰/۵ میکرولیتر از محلول اتیدیوم بروماید به آن اضافه کرده و پس از توزیع یکنواخت آن، محلول را به قالب شانه گذاری شده تانک الکتروفورز می‌ریزیم.

پس از بسته شدن کامل ژل، شانه‌ها را از قالب خارج کرده و ژل را به تانک الکتروفورز منتقل و تانک با محلول TAE (IX) پر می‌شود، به طوری که کاملاً روی ژل را بپوشاند. سپس در هر چاهک از محصول PCR (۵ میکرولیتر) لود می‌شود. در یکی از چاهک‌ها مارکر وزن مولکولی مناسب لود می‌شود که امکان بررسی و تایید قطعه با توجه به طول باند وجود داشته باشد. سپس تانک الکتروفورز را به دستگاه مولد برق متصل و دستگاه بر روی ولتاژ ۸۰ ولت تنظیم می‌شود (۱۰ ولت در هر سانتی‌متر). پس از طی زمان لازم، دستگاه مولد برق را قطع و ژل را به دستگاه illuminator UV Trans (ژل داکيومنت) برای رویت باندها انتقال می‌دهیم.

آنزیم‌های محدود کننده توالی‌های شناسایی ویژه‌ای در DNA دارند و در نتیجه تغییرات توالی در DNA ژنومی منجر به ایجاد یا حذف محل‌های شکسته شدن ویژه‌ای می‌شوند و لذا اندازه یک یا بیشتر قطعات DNA را تغییر می‌دهند آنزیم‌های این مطالعه بوسیله نرم‌افزار بیو انفورماتیک در سایت NEB Cutter بررسی می‌شوند (شکل ۲-۳).

تنوعات موجود بر پایه DNA در محل‌های محدود کننده چندشکلی در طول قطعات محدود RFLP نامیده می‌شوند. RFLP ها ممکن است بیشتر از یک قطعه از یک تغییر نوکلئوتیدی منفرد، از حذف یا الحاق ناشی شود. اگر یک قطعه از DNA بین دو محل محدود کننده دچار حذف یا اضافه شود، اندازه قطعه محدود کننده حاصل متفاوت خواهد بود.

RFLP های ناشی از تغییرات در محل‌های شکسته شدن اندونوکلاز محدودکننده ویژه، یک زیرگروه کوچک از طبقه کلی تر پلی- مورفیسیم هستند که پلی مورفیسیم‌های نوکلئوتید منفرد^۱ (SNPs) نامیده می‌شوند. SNP ها به طور یکنواخت و شایعی در تمامی ژنوم منتشر هستند. این مشخصات آنها را نشانگرهای بسیار عالی ژنتیکی برای تشخیص مولکولی می‌کنند.



شکل ۲-۳- نمایش مراحل بیوانفورماتیکی انتخاب آنزیم Ava I برای موتاسیون ۵۱۱- اینتر لوکین یک بنا

۲-۷- روش انجام RFLP بر روی محصولات PCR

به منظور RFLP بر روی محصول PCR هر جفت پرایمر، از آنزیم محدودالاثر^۲ (RE) و بافر (10X) مناسب آن و میزان مناسبی از محصول PCR استفاده می‌شود.

۱. بافر (مناسب هر آنزیم) (10X): 1 µl
۲. محصول PCR: 7 µl
۳. آنزیم محدودالاثر: 1 µl
۴. آب مقطر دیونیزه دو بار تقطیر: 1 µl

¹ -Single nucleotide polymorphism (SNP)
² Restriction Enzyme(RE)

* حجم نهایی 10 μ l

برای بررسی نتیجه RFLP، از الکتروفورز بر روی ژل آگارز برای مقایسه دقیق طول باندها استفاده شد. با توجه به نتایج مشاهده شده بر روی ژل آگارز، ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی‌مورفیسم مشخص شد.

۲-۸- روش‌های آماری مورد استفاده

اطلاعات بدست آمده توسط نرم افزار SPSS 13.0 بررسی شد. چگونگی وقوع این پلی‌مورفیسم به سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از آزمون χ^2 و Mann-Whitney بررسی شد. نتایج با $p\text{-value} < 0/05$ معنی‌دار تلقی گردیدند. سپس با ادغام دو گروه هموزیگوت و هتروزیگوت، گروه جدیدی ایجاد شد. جهت بررسی اثر هر پلی‌مورفیسم بر وقوع سقط مکرر از مدل رگرسیون لجستیک یک متغیره استفاده شد. سپس جهت بررسی اثر همزمان موتاسیون‌ها بر شانس وقوع سقط مکرر از مدل رگرسیون لجستیک چندگانه به روش پس رو بکار رفت.

Archive of SID



فصل سوم

نتایج

Archive of SID

۱-۳ بررسی دموگرافیک جمعیت مورد مطالعه

بررسی‌های آماری اطلاعاتی دموگرافیک دو گروه بیماران سقط مکرر و گروه کنترل نشان داد که اختلاف معناداری در قد و وزن افراد این دو گروه وجود ندارد (جدول ۱-۳). ولی اختلاف معناداری در سن و سن اولین بارداری وجود دارد ($P < 0.001$). بطوری که متوسط سن و سن اولین بارداری در گروه بیماران سقط مکرر به ترتیب $30/61 \pm 6/00$ و $25/45 \pm 5/49$ و در گروه کنترل به ترتیب $36/09 \pm 4/72$ و $21/14 \pm 3/87$ می باشد. به دلیل اینکه این دو گروه با دو علت مختلف به کلینیک مراجعه کرده اند (مشکلات مرتبط با سقط مکرر یا تعیین جنسیت جنین)، سن و سن اولین بارداری دارای اختلاف معنادار در دو گروه می باشد. لازم به ذکر است که سن در بررسی‌های ژنتیک مرتبط با DNA یک عامل مداخله ای محسوب نمی گردد، چون DNA هر فردی در طول عمر یکسان می باشد.

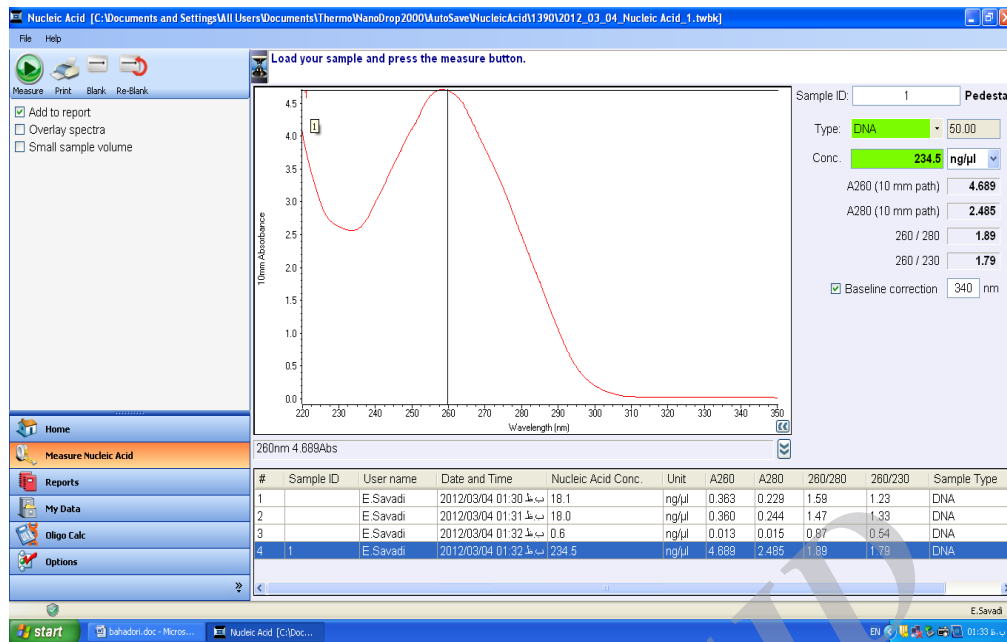
جدول ۱-۳ نتایج دموگرافیک وزن، قد، سن و سن اولیه بارداری در دو گروه بیماران سقط مکرر و گروه کنترل:

متغیر دموگرافیک	گروه	میانگین	انحراف معیار	p-value*
قد	کنترل	160.55	6.05	0.960
	سقط مکرر	160.59	5.68	
وزن	کنترل	71.90	9.98	0.017
	سقط مکرر	68.44	12.10	
سن در اولین بارداری	کنترل	21.14	3.87	<0.001
	سقط مکرر	25.45	5.49	
سن	کنترل	36.09	4.72	<0.001
	سقط مکرر	30.61	6	

*t-test

۲-۳- بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده

بعد از استخراج DNA و به منظور بررسی کمی DNA استخراج شده، آنالیز اسپکتروفوتومتری انجام شد تا از غلظت آنها اطمینان حاصل شود. این کار با دو هدف صورت می‌گیرد: اولاً از جهت اینکه در هر میکرولیتر چند نانوگرم DNA وجود دارد، ثانیاً خلوص DNA مشخص می‌شود. سپس با اندازه گیری OD در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مقدار DNA محاسبه شد. متوسط میزان جذب DNA که توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر برای نمونه‌های نوکلئیک اسید استخراجی خوانده شد به شرح زیر می‌باشد (شکل ۱-۳ و جدول ۱-۳).



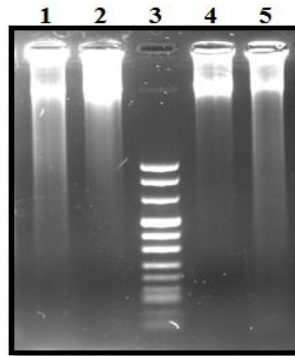
شکل ۳-۱: بررسی غلظت DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (نانودراپ).

جدول ۳-۲: بررسی کمی DNA

نتایج بررسی کمی DNA	
۲۳۵ ng/μl	غلظت DNA
۱/۸۹	نسبت 260/280 nm
۱/۷۹	نسبت 260/230 nm
۰/۱۵۴	جذب در طول موج 260 nm
۰/۱۲۳	جذب در طول موج 280 nm
۰/۱۳۴	جذب در طول موج 230 nm

همانطور که مشاهده شد میزان جذب در طول موج 260/280 nm بالای ۱/۵ بوده که نشان دهنده این است که نمونه DNA تقریباً عاری از پروتئین است و جذب 260/230 nm هم بالای ۱ بوده که در اینصورت میزان کربوهیدرات در نمونه DNA بسیار پایین و تقریباً صفر است.

به منظور تایید کیفی DNA تخلیص شده، الکتروفورز نمونه بر روی ژل آگارز انجام شد. بعد از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگارز ۱٪، در تمام نمونه‌ها تک نوار مشاهده شد و نتایج نشان دهنده کیفیت بسیار خوب DNA استخراج شده بود (شکل ۳-۱).



شکل ۳-۲: درالکتروفورز نمونه های DNA بر روی ژل آگاروز ۱٪.

چاهک‌های ۴، ۲، ۱، ۵ نشانگر ۴ عدد از نمونه‌های استخراج شده‌است و چاهک شماره ۳ نشانگر مارکر استاندارد DNA می‌باشد.

۳-۳- انتخاب پرایمرهای مناسب

برای هر پلی‌مورفیسم با شرایطی که در فصل ۲ بحث شد، یک جفت پرایمر طراحی شد (جدول ۳-۳).

جدول ۳-۳- توالی جفت پرایمرها مورد استفاده در این پژوهش.

محصول RFLP	آنزیم محدودکننده	محصول PCR (bp)	توالی پرایمرها	پلی مورفیسم
(249)* (135, 114 bp)**	TaqI	249	F: 5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3' R: 5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3'	IL_1beta T/C +3954
(239)* (137,102 bp)**	AluI	239	F: 5'-AGAAGCTTCCACCAATACTC-3' R: 5'-AGCACCTAGTTGTAAGGAAG-3'	IL_1beta -31 T/C
(305)* (190, 115 bp)**	AvaI	305	F: 5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' R: 5'-GTTTAGGAATCTTCCCCTT-3'	IL_1beta -511 C/T
(380)* (269,111bp)**	SspI	380	F: 5'- TTGTGGGGACCAGGGGAGAT -3' R: 5'- AGCCTGGCACTCTGCTGAAT-3'	IL-1RN +9589 A/T
(225)* (179, 46 bp)**	MwoI	225	F: 5'- ACACAGGAAGGTGCCAAGCA -3' R: 5'- TGCAGACAGACGGGCAAAGT -3'	IL-1RN +8061 C/T
(330)* (132,198bp)**	MspAII	330	F:5'- AGGGAGGCAGCACAGGACTT -3' R: 5'- AGTCCCTGCAGTCCTTGCCA -3'	IL-1RN T/C +11100
(198)* (140,58 bp)**	NlaIII	198	F:5'- TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT -3' R: 5'- CTGATTGGAAACCTTATTAAG -3'	IL-6 G/C -174
(412)* (236,176bp)**	RsaI	412	F:5'- GGTGAGCACTACCTGACTAGC -3' R: 5'- CCTAGGTCACAGTGACGTGG -3'	IL-10 -592 A/C
(209)* (125,84 bp)**	Mae III	209	F:5'- TCATTCTATGTGCTGGAGATG -3' R: 5'- TGGGGGAAGTGGGTAAGAGT -3'	IL-10 -819 T/C
(137)* (23 , 114 bp)**	MnII	136	F:5'- CTCGCCCAACCCAACTGGC -3' R: 5'- TCTTACCTATCCCTACTTCC -3'	IL-10 G/-1082 A
(236)* (178,32,26 bp)**	NlaIV	236	F:5'- CTTCCGTGAGGACTGAATGAGACGGTC3' R:5'GCAAATAATGATGCTTTCGAAGTTTCAGTG-3'	IL-13 +2044 G/A
(246)* (223 ,23bp)**	BstUI	246	F:5'- GGAATCCAGCATGCCTTGTGAGG-3' R: 5'- GTCGCCTTTTCTGCTCTTCCCCGC-3'	IL-13 C/T -1055
(344)* (213, 131bp)**	XmnI	344	F:5'- CAGAAGACCTACATGTTACT-3' R:5'- GTAGCGCTATCGTCTCTCT-3'	IL-17 A/-197 G

** محصول RFLP

* محصول PCR

جدول ۳-۴- جایگاه برش آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش

آنزیم محدودالایتر	جایگاه برش
TaqI	CCTATCTTCT T YG ▲A CACATGGGAT
AluI	AGA AG ▲CT TCCCAATA
AvaI	ACAGAGAGYT C CYGA ▲G GCAGAGAACA
SspI	TGAAACAACC AAW ▲ATT TTTTCTTATG
MwoI	GTGAGTGGTT GCCAGGA AAGY
MspAII	TCCGCTCAGAC AG ▲YGGCCCCACCACC
NLa III	TTTGCAAGA▲ CATG CCAAAGTGCT AND TGTGTCTTGC▲ CATG CTAAGGACG
RsaI	GACCCCGCCT GT ▲AC TGTAGGAAGC
MaeIII	TACAGGTGAT GTAAY ATCTCTGTGC
MnII	GCT▲T CTTTGG GARG GGAAGTAGG
NlaIV	TTTTTCGCGA GGGACN GTTCAACTGA
BstUI	GTGGGGGTTT CTGGAG GACTTCTAGG
XmnI	TCCTTCAGAA GRAGA ▲GATTC TTCTATGACC

۳-۴- شرایط PCR

پس از انتخاب پرایمرها، برنامه PCR برای هر جفت پرایمر بهینه سازی شد. بدین معنا که تعداد سیکل، زمان Ta Annealing و میزان $MgCl_2$ مناسب برای هر برنامه PCR برای هر جفت پرایمر تعیین شد (جدول ۳-۳).

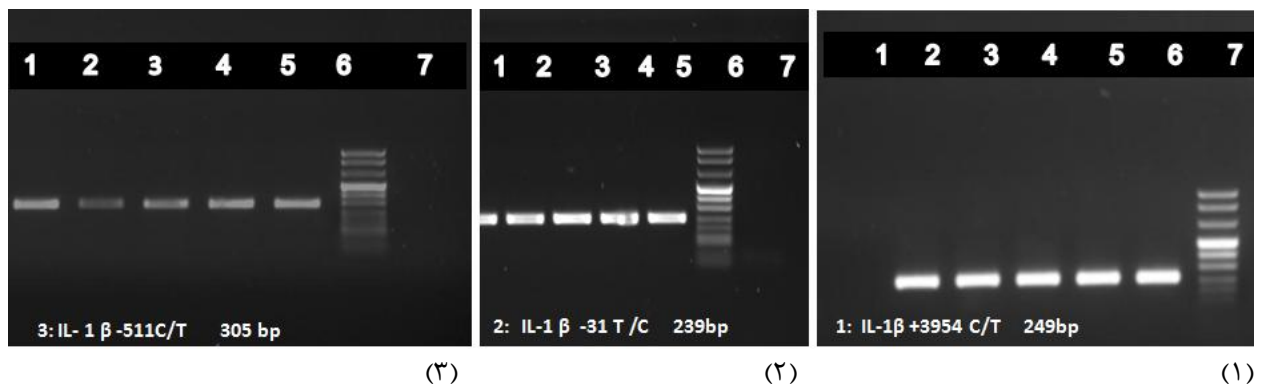
Archive of SID

جدول ۳-۵- برنامه PCR بهینه سازی شده برای هر جفت پرایمر.

میزان MgCl ₂ برای هر Master Mix (μl)	طولیل سازی نهایی (دما) (C) و مدت (دقیقه))	طولیل سازی (دما) (C) و مدت (ثانیه))	اتصال (دما) (C) و مدت (ثانیه))	دنا تورا سیون (دما) (C) و مدت (ثانیه))	دنا تورا سیون اولیه (دما) (C) و مدت (دقیقه))	تعداد سیکل	مراحل PCR پرایمر
۱,۵	۷۲ (۷)	۷۲ (۳۰)	۵۰,۷ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۴۰	IL_1beta +3954 C/T
۲	۷۲ (۱۰)	۷۲ (۶۰)	۶۲ (۶۰)	۹۴ (۶۰)	۹۴ (۳)	۳۵	IL_1beta -31 C/T
۱,۵	۷۲ (۱۰)	۷۲ (۴۰)	۶۰ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۰	IL_1beta -511 C/T
۲	۷۲ (۵)	۷۲ (۴۵)	۶۲,۹ (۴۳)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۵	IL-1RN +9589 A/T
۴	۷۲ (۵)	۷۲ (۴۲)	۶۳ (۳۶)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۵	IL-1RN +8061 C/T
۳	۷۲ (۵)	۷۲ (۴۲)	۶۳,۵ (۳۲)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۶	IL-1RN +11100T/C
۲	۷۲ (۱۰)	۷۲ (۴۰)	۵۷ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۴۰	IL-6 -174 G/C
۳	۷۲ (۱۰)	۷۲ (۴۰)	۵۹ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۰	IL-10 -592 A/C
۲	۷۲ (۱۰)	۷۲ (۴۵)	۶۰ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۵)	۳۵	IL-10 -819 T/C
۱,۵	۷۲ (۷)	۷۲ (۱۵)	۶۱ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۶	IL-10 -1082 A/G
۲	۷۲ (۷)	۷۲ (۳۰)	۶۵ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۵	IL-13 +2044 G/A
۳	۷۲ (۷)	۷۲ (۳۰)	۶۶,۵ (۳۰)	۹۴ (۳۰)	۹۵ (۴)	۳۶	IL-13 -1055C/T
۱,۵	۷۲ (۵)	۷۲ (۳۰)	۵۸ (۴۰)	۹۴ (۳۰)	۹۴ (۳)	۳۲	IL-17 -197 G/A

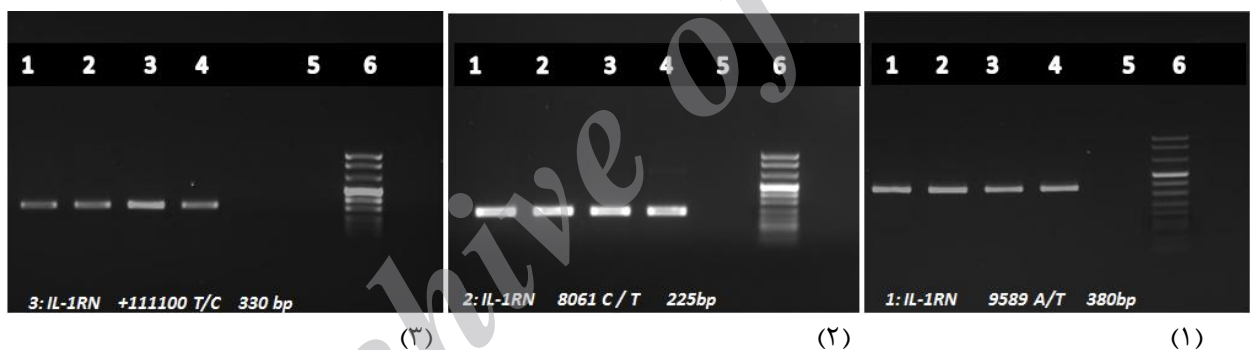
پس از بهینه سازی برنامه PCR برای هر جفت پرایمر، برای ۲۰۰ نمونه بیمار و ۱۰۰ نمونه کنترل آزمون PCR انجام گرفت. سپس برای صحت انجام PCR، با انجام الکتروفورز برای محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪، و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل آگارز زیر نور UV مشاهده شد. مارکر مورد استفاده برای تایید باندهای مورد نظر، مارکر VIII شرکت روش می باشد (۱۱۱۴-۱۹ جفت باز) (شکل های ۲-۳ تا ۸-۳).

۳-۴-۱- نتایج PCR :



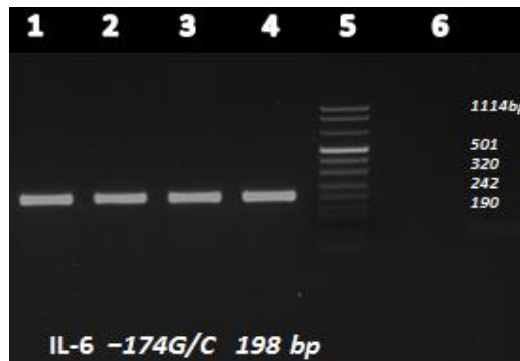
شکل ۳-۳- الکتروفورز محصول PCR برای IL-1beta.

(۱) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون +3954 C/T = ۱؛ کنترل منفی / ۳، ۲، ۵، ۴ و ۶؛ باند 249 bp محصول PCR / ۷؛ مارکر وزن مولکولی VIII.
 (۲) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون -31 T/C = ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵؛ باند 239 bp محصول PCR / ۶؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۷؛ کنترل منفی.
 (۳) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون -511 C/T = ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵؛ باند 305 bp محصول PCR / ۶؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۷؛ کنترل منفی.



شکل ۳-۴- الکتروفورز محصول PCR برای IL-1RN :

(۱) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون 9589 A/T + : ۱، ۲، ۳ و ۴؛ باند ۳۸۰ bp محصول PCR - ۵؛ کنترل منفی - ۶؛ مارکر وزن مولکولی VIII.
 (۲) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون 8061 C/T + : ۱، ۲، ۳ و ۴؛ باند ۲۲۵ bp محصول PCR - ۵؛ کنترل منفی - ۶؛ مارکر وزن مولکولی VIII.
 (۳) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون 111100T/C + : ۱، ۲، ۳ و ۴؛ باند ۳۳۰ bp محصول PCR - ۵؛ کنترل منفی - ۶؛ مارکر وزن مولکولی

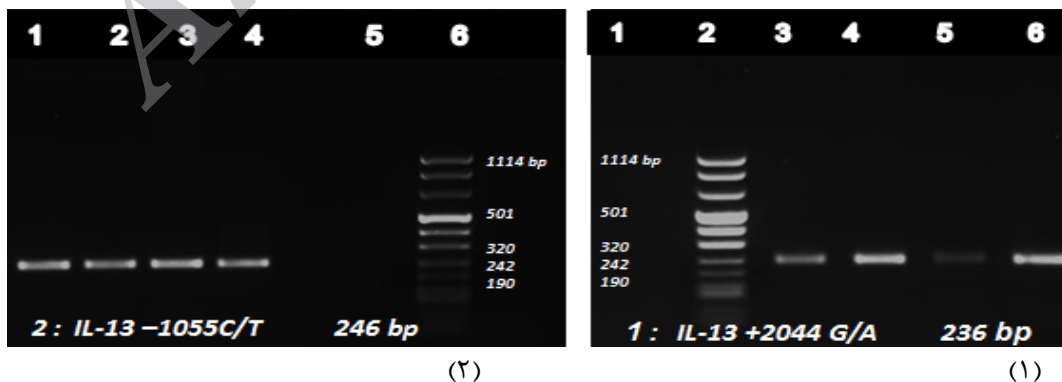


شکل ۳-۵ - الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین ۶ :
 ۱، ۲، ۳، ۴ - باند ۱۹۸ bp محصول IL-6 -174 G/C PCR ؛ ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII - ۶؛ کنترل منفی.



شکل ۳-۶ - الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین ۱۰ :

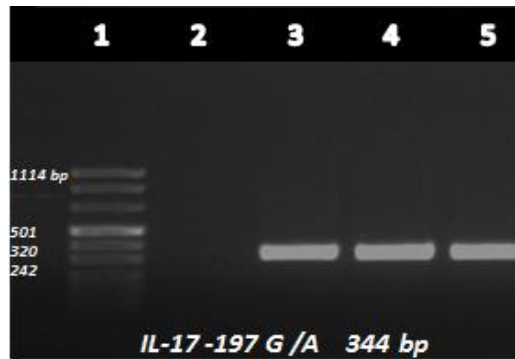
- (۱) الکتروفورز محصول PCR برای پلی مورفیسم IL-10 موتاسیون -592 A/C : ۱؛ کنترل منفی / ۲؛ مارکر وزن مولکولی VIII - ۳-۶؛ باند ۴۱۲ bp محصول PCR برای IL-10 موتاسیون -592 A/C.
- (۲) الکتروفورز محصول PCR برای پلی مورفیسم IL-10 موتاسیون -819 C/T : ۱؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۲-۶؛ باند ۲۰۹ bp محصول PCR برای IL-10 موتاسیون -819 T/C و ۷؛ کنترل منفی.
- (۳) الکتروفورز محصول PCR برای پلی مورفیسم IL-10 موتاسیون -1082 A/G : ۱-۳؛ باند ۱۳۶ bp محصول PCR برای IL-10 موتاسیون - 1082 A/G / ۴؛ کنترل منفی و ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII.



شکل ۳-۷ - الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین ۱۳ :

- (۱) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون +2044 G/A : ۱؛ کنترل منفی / ۲؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۳-۶؛ باند ۲۳۶ bp محصول PCR برای IL-13 موتاسیون +2044 G/A .

(۲) الکتروفورز محصول PCR برای موتاسیون **C/T-1055**: ۴-۱؛ باند ۲۴۶ bp محصول PCR برای IL-13 موتاسیون **C/T-1055** / ۵؛ کنترل منفی / ۶؛ مارکر وزن مولکولی VIII



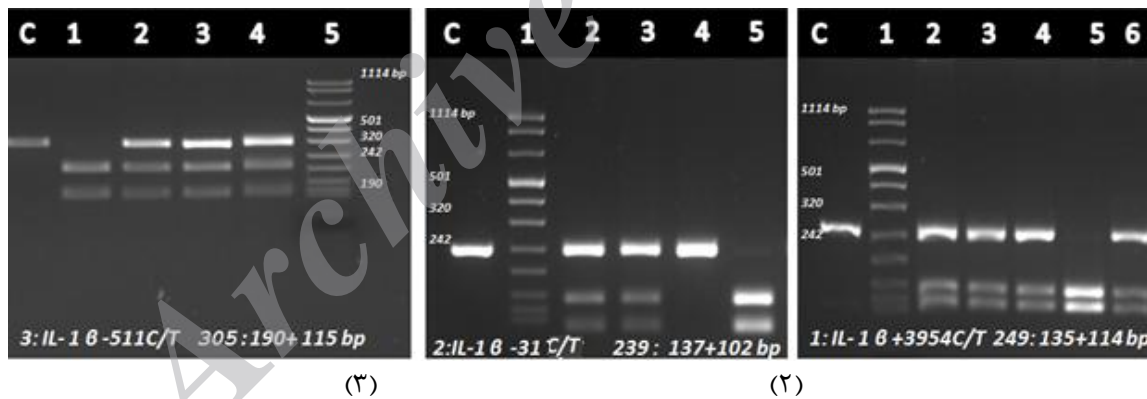
شکل ۳-۸- الکتروفورز محصول PCR برای اینترلوکین ۱۷:

۱؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۲؛ کنترل منفی / ۳-۵؛ باند ۳۴۴ bp محصول PCR IL-17 موتاسیون **G/A-197**

۳-۵- نتایج RFLP

پس از تایید صحت انجام PCR، برای بررسی ژنوتیپ هر فرد و هر پلی مورفیسم، RFLP بر روی محصول PCR انجام شد. به منظور RFLP از آنزیم محدودالایتر^۱ و بافر مناسب آن و میزان مناسبی از محصول PCR استفاده می‌شود (جدول ۳-۲). برای بررسی نتیجه RFLP، از الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد (تصاویر ۳-۹ تا ۳-۱۴).

۳-۵-۱- پلی مورفیسم خانواده اینترلوکین یک بتا



شکل ۳-۹- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین یک بتا (**IL-1β**) بر روی ژل آگارز ۲/۵٪:

(۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین یک بتا موتاسیون **C/T+3954** با استفاده از آنزیم محدودالایتر **TaqI**: C؛ قطعه تکثیر شده ۲۴۹ جفت باز بعنوان کنترل / ۱؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۲، ۳، ۴ و ۶؛ هتروزیگوت/ ۵؛ هموزیگوت بیمار.

(۲) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین یک بتا موتاسیون **C/T-31** با استفاده از آنزیم محدودالایتر **AluI**: C-؛ قطعه تکثیر شده ۲۳۹ جفت باز بعنوان کنترل / ۱؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۲ و ۳؛ هتروزیگوت / ۴؛ نرمال / ۵؛ هموزیگوت (بیمار).

¹ Restriction Enzyme(RE)

(۳) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین یک بتا موتاسیون C/T-511 با استفاده از آنزیم محدودالایتر Aval: C؛ قطعه تکثیر شده ۳۰۵ جفت باز بعنوان کنترل / ۱؛ هموزیگوت / ۲،۳ و ۴؛ هتروزیگوت / ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

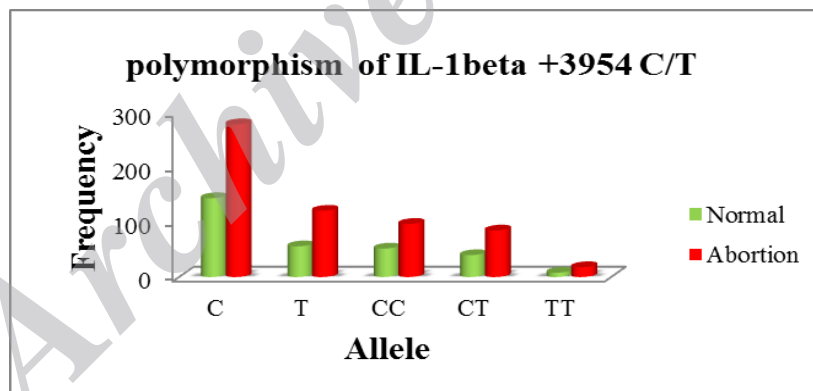
۳-۵-۱-۱- اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۹۵۴+

این جایگاه در داخل آگزون ژن می‌باشد. فراوانی آلل‌های C و T در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. در موقعیت ۳۹۵۴+ برای گروه کنترل، ۷۲٪ احتمال وجود آلل C و ۶۶٪ درصد احتمال وجود آلل T می‌باشد. برای گروه بیمار آلل C و T بترتیب ۶۹/۷۵٪ و ۶۰/۵۰٪ می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های C و T مشاهده نشد (p-value = 0.560, Mann-Whitney) (جدول ۳-۵ و نمودار ۱-۳).

جدول ۳-۶ مقایسه فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین ۱ بتا

Allele/ Genotype IL-β +3954 C/T	Control n=100 F	(%)	Patients n=200 F	(%)
C	144	72	279	69.75
T	56	66	121	60.5
CC	52	52	97	48.5
TC	40	40	85	42.5
TT	8	8	18	9

n=Number F=Frequency



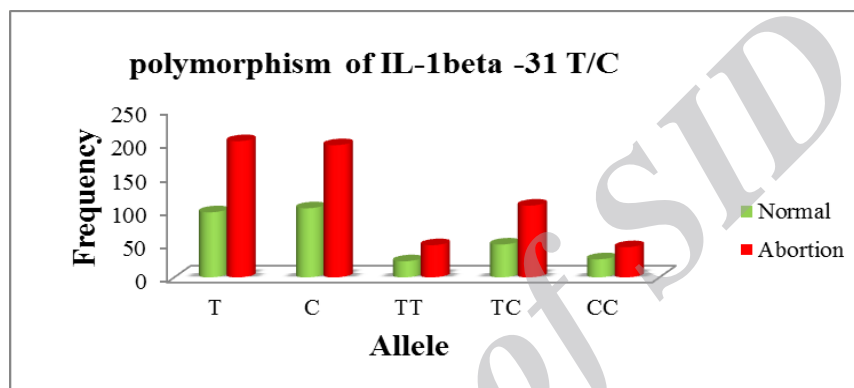
نمودار ۱-۳: مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آلی و ژنوتایپی اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۹۵۴+.

۳-۵-۱-۲- اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۱-

فراوانی آلل‌های C و T در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. در موقعیت ۳۱-، در بررسی نرمال، ۴۸/۵۰٪ احتمال وجود آلل C و ۵۱/۵۰٪ احتمال وجود آلل T می‌باشد، در حالیکه در گروه بیمار بترتیب ۵۰/۷۵ و ۶۰/۵۰ درصد می‌باشد. همین‌طور فرکانس ژنوتایپ‌های CC، TC و TT حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های C و T مشاهده نشد (p-Value= 0.596, Mann-Whitney) (جدول ۳-۶ و نمودار ۲-۳).

جدول ۳-۷ مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۱-:

Allele/ Genotype IL-β-31 T/C	Control n=100 F	%	Patients n=200 F	%
T	97	48.5	203	50.75
C	103	51.5	197	60.5
TT	27	24	48	24
TC	49	49	107	53.5
CC	24	27	45	22.5



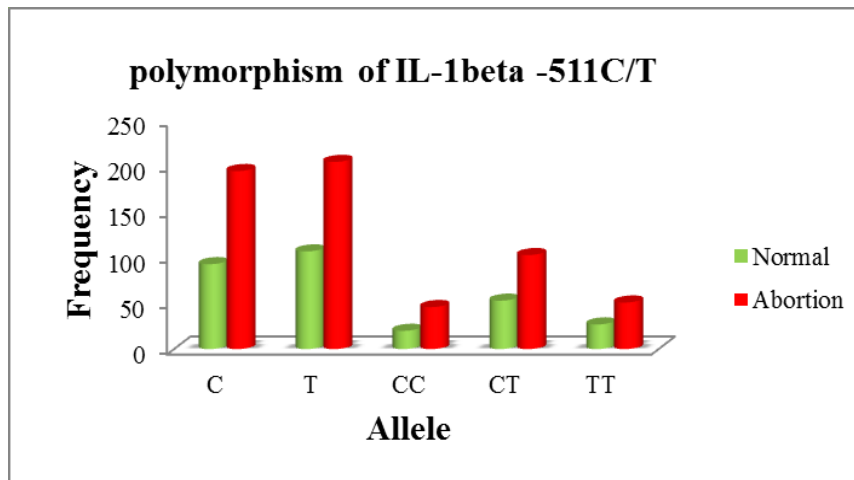
نمودار ۳-۲: مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۳۱-.

۳-۱-۵-۳- اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۵۱۱-

فراوانی آلل‌های C و T در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۴۶/۵۰٪ احتمال وجود آلل C و ۵۳/۵۰٪ احتمال وجود آلل T می‌باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ‌های TC, CC و TT حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های C و T مشاهده نشد (p-Value= 0.600, Mann-Whitney) (جدول ۳-۷ و نمودار ۳-۳).

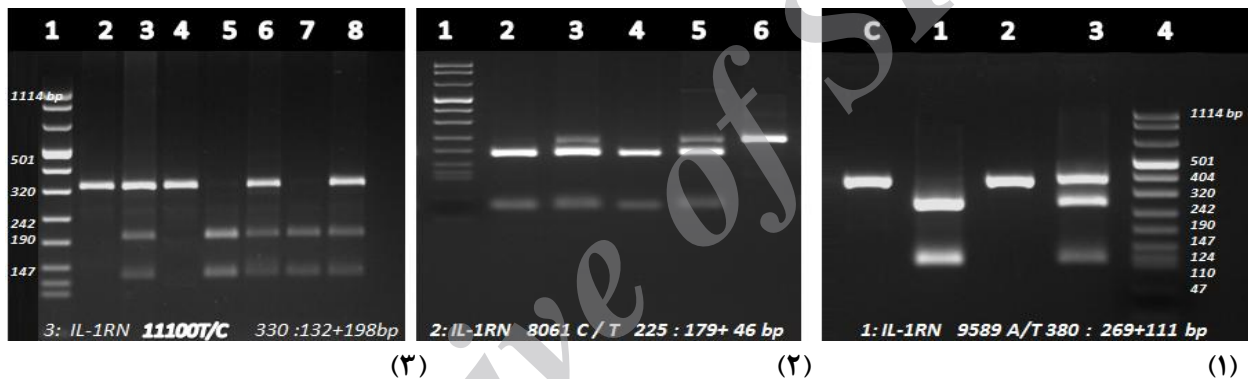
جدول ۳-۸- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی یک بتا در موقعیت ۵۱۱-

Allele/ Genotype IL-β-511 C/T	Control n=100 F	%	Patients n=200 F	%
C	93	46.5	195	48.75
T	107	53.5	205	51.25
CC	20	20	46	23
CT	53	53	103	51.5
TT	27	27	51	25.5



نمودار ۳-۳- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین یک بتا در موقعیت ۵۱۱-.

۳-۵-۲- پلی مورفیسم خانواده گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک



شکل ۳-۱۰- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک (IL-1RN) بر روی ژل آگاروز ۲/۵٪:

(۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک موتاسیون 9589 A/T+ با استفاده از آنزیم محدودالایر SspI : C- قطعه تکثیر شده ۳۸۰ جفت باز بعنوان کنترل / ۱؛ هموزیگوت ۲؛ سالم / ۳؛ هتروزیگوت ۴؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

(۲) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک موتاسیون 8061 C/T+ با استفاده از آنزیم محدودالایر MwoI : بر روی قطعه تکثیر شده ۲۲۵ جفت بازی ۱؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۲، ۴؛ هموزیگوت / ۳، ۵؛ هتروزیگوت / ۶؛ نرمال.

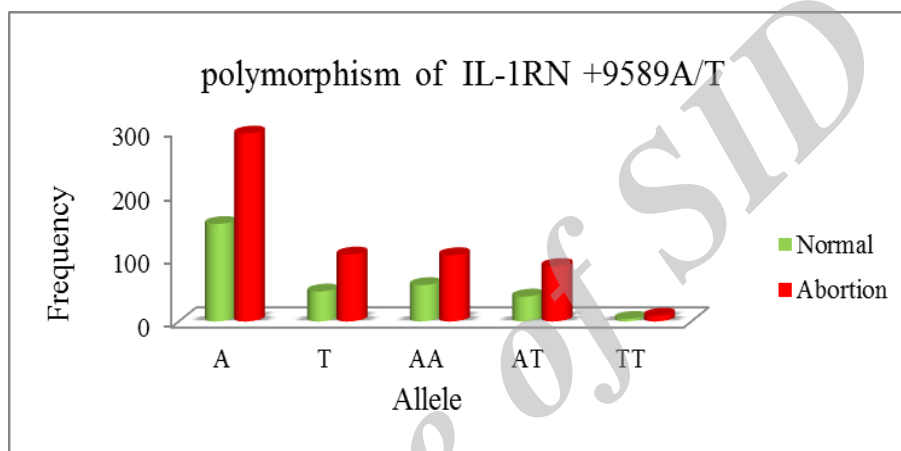
(۳) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک موتاسیون 11100 T/C+ با استفاده از آنزیم محدودالایر MspAII: بر روی قطعه تکثیر شده ۳۳۰ جفت بازی ۱؛ مارکر وزن مولکولی VIII / ۲، ۴؛ نرمال / ۳، ۶ و ۸؛ هتروزیگوت / ۵ و ۷؛ هموزیگوت.

۳-۵-۲-۱- گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۹۵۸۹+

فراوانی آلل‌های A و T در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۷۶/۵۰٪ احتمال وجود آلل A و ۲۳/۵۰٪ احتمال وجود آلل T می‌باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ‌های AA، TA و TT حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های A و T مشاهده نشد (p-Value= 0.420, Mann-Whitney) (جدول ۳-۸ و نمودار ۳-۴).

جدول ۳-۹- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت +۹۵۸۹:

Allele/ Genotype +9589A/T IL-1RN	Control n=100 F	%	Patients n=200 F	%
A	153	76.5	295	73.75
T	47	23.5	105	26.25
AA	57	57	104	52
AT	39	39	87	43.5
TT	4	4	9	4.5



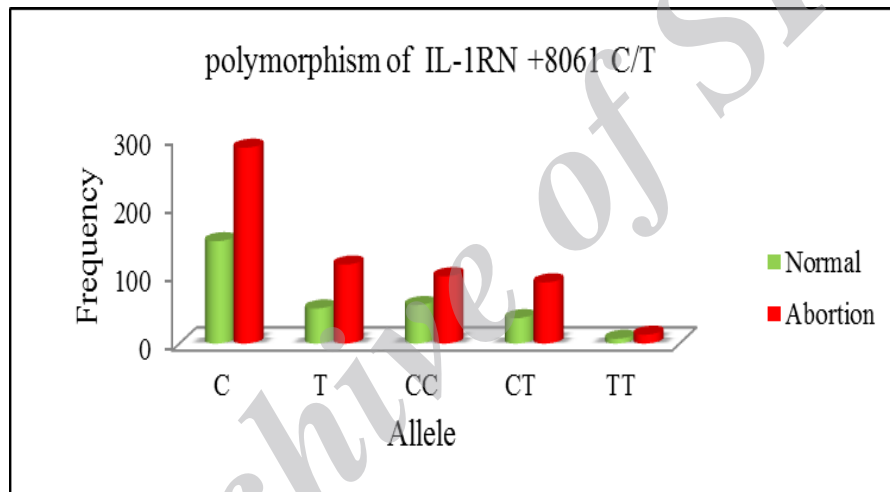
نمودار ۳-۴- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت +۹۵۸۹.

۳-۵-۲-۲- گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۸۰۶۱+:

فراوانی آلل‌های C و T در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۷۶/۵۰٪ احتمال وجود آلل C و ۲۳/۵۰٪ احتمال وجود آلل T می‌باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ‌های CC، CT و TT حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های C و C مشاهده نشد (p-Value= 0.318, Mann-Whitney) (جدول ۳-۹ و نمودار ۳-۵).

جدول ۳-۱۰- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی آنتاگونیست اینترلوکین یک

Allele/ Genotype IL-1RN + 8061 C/T	Control n=100		Patients n=200	
	F	%	F	%
C	149	74.5	285	71.25
T	51	25.5	115	28.75
CC	56	56	98	49
CT	37	37	89	44.5
TT	7	7	13	6.5



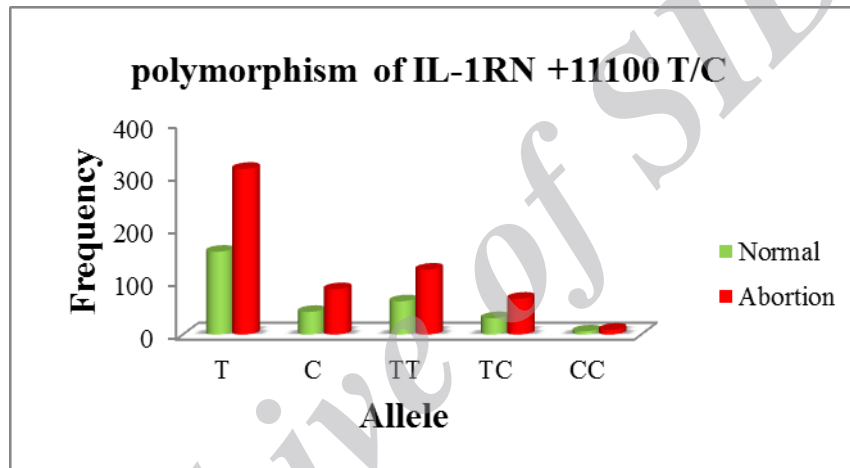
نمودار ۳-۵- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۸۰۶۱+.

۴-۵-۲-۳- گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک در موقعیت ۱۱۱۰+

فراوانی آلل های T و C در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۷۸/۵۰٪ احتمال وجود آلل T و ۲۱/۵۰٪ احتمال وجود آلل C می باشد. همینطور فرکانس ژنوتایپ های TT، CT و CC حاصله در این دو جمعیت بررسی شد. اختلاف معنی داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل های T و C مشاهده نشد (p-Value = 0.887, Mann-Whitney) (جدول ۳-۱۰ و نمودار ۳-۶).

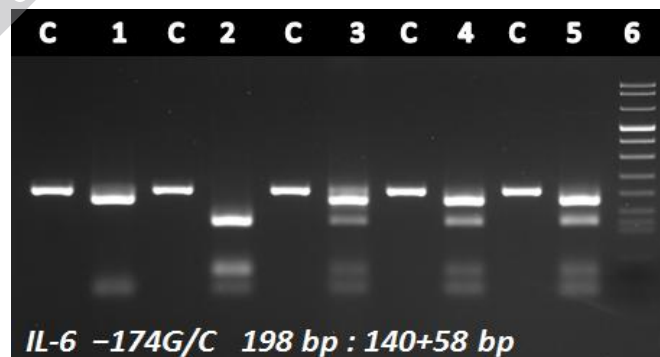
جدول ۳-۱۱- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک.

Allele/ Genotype IL-1RN +11100 T/C	Control n =100 F (%)	%	Patients n=200 F	%
T	157	78.5	314	78.5
C	43	21.5	86	21.5
TT	63	63	123	61.5
TC	31	31	68	34
CC	6	6	9	4.5



نمودار ۳-۶- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین یک در موقعیت +۱۱۱۰۰.

۳-۵-۳- پلی مورفیسم اینترلوکین شش



شکل ۳-۱۱- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین شش بر روی ژل ۳٪:

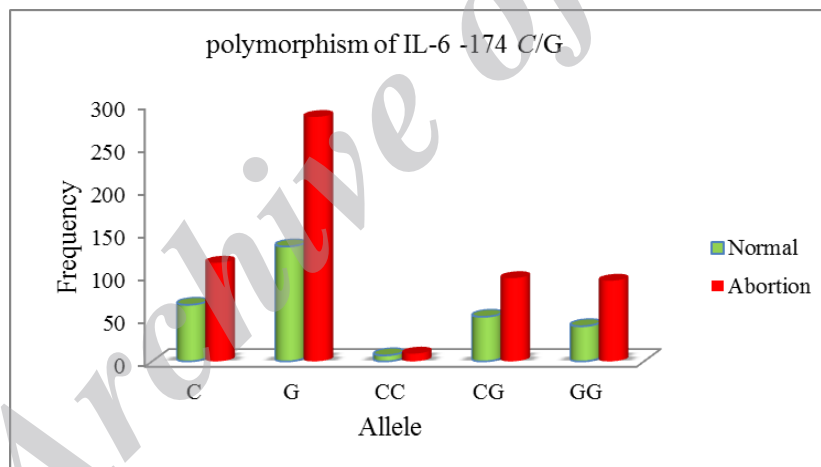
(۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین شش 174 G/C- با استفاده از آنزیم محدودالاندر C: NlaIII- قطعه تکثیر شده ۱۹۸ جفت باز بعنوان کنترل ۱- هموزیگوت ۲- سالم ۳،۴ و ۵- هتروزیگوت ۶- مارکر وزن مولکولی VIII.

۳-۵-۳-۱- اینترلوکین شش در موقعیت ۱۷۴-

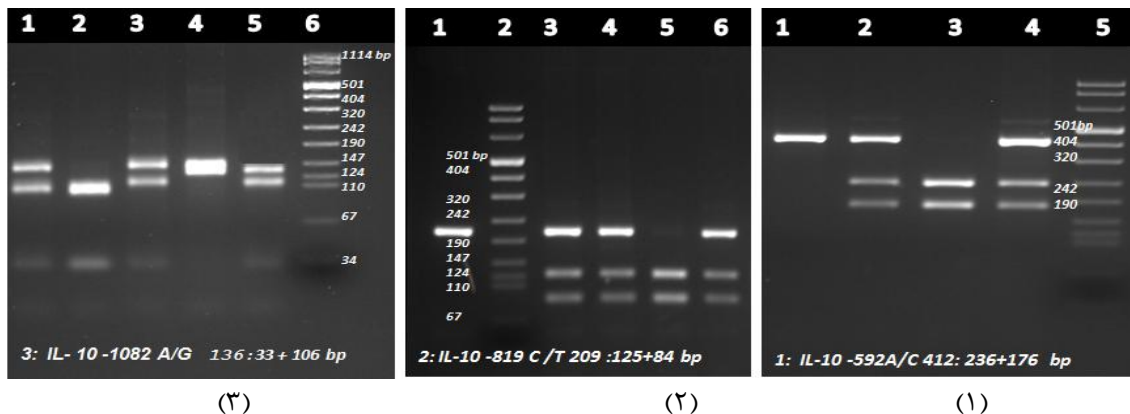
فراوانی آلل‌های C و G در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۳۳٪ احتمال وجود آلل C و ۶۷٪ احتمال وجود آلل G می‌باشد، و برای گروه بیمار ۲۸/۷۵ و ۷۱/۲۵ درصد به ترتیب برای آلل‌های C و G مشاهده شد. در این مقایسه نیز اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد (p-Value= 0.261, Mann-Whitney) (جدول ۳-۱۱ و نمودار ۳-۷).

جدول ۳-۱۲- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین شش

Allele/ Genotype IL-6 -174 C/G	Control n=100 F	%	Patients n=200 F	%
C	66	33	115	28.75
G	134	67	285	71.25
CC	7	7	9	4.5
CG	52	52	97	48.5
GG	41	41	94	47



نمودار ۳-۷: مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین شش در موقعیت ۱۷۴-.



شکل ۳-۱۲- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین ده (۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین ده موتاسیون 592 A/C- با استفاده از آنزیم محدودالایتر *RsaI* بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ (قطعه تکثیر شده ۴۱۲ جفت بازی): ۱- سالم ۲ و ۴ - هتروزایگوت ۳- هموزایگوت ۵ - مارکر وزن مولکولی VIII.

(۲) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین ده موتاسیون 819 T/C- با استفاده از آنزیم محدودالایتر *Mae III* بر روی ژل آگارز ۲/۵٪ (قطعه تکثیر شده ۲۰۹ جفت بازی): ۱- نرمال ۲ - مارکر وزن مولکولی VIII ۳، ۴ و ۶ - هتروزایگوت ۵- هموزایگوت.

(۳) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین ده 1082 A/G- با استفاده از آنزیم محدودالایتر *MnII* بر روی ژل آگارز ۴٪ (قطعه تکثیر شده ۱۳۶ جفت بازی): ۱ و ۳ - هتروزایگوت ۲ - هموزایگوت ۴ - نرمال ۶ - مارکر وزن مولکولی VIII.

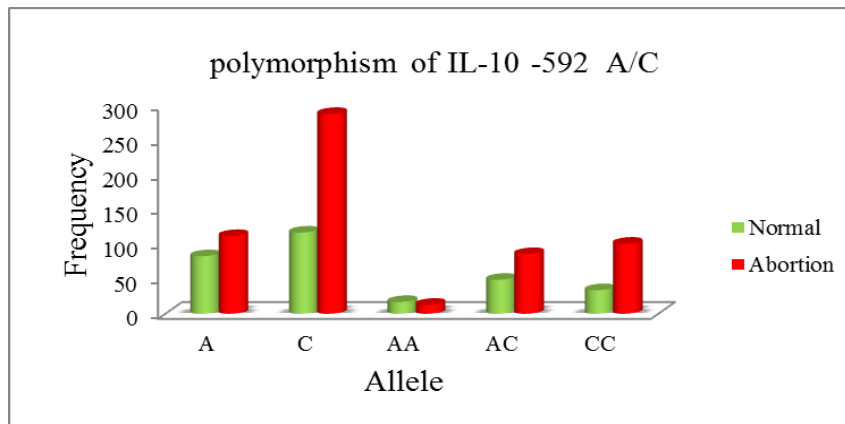
۳-۵-۴- پلی مورفیسم خانواده اینترلوکین ده

۳-۵-۴-۱- اینترلوکین ده در موقعیت ۵۹۲ -

فراوانی آلل‌های A و C در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۴۱/۵۰٪ احتمال وجود آلل A و ۵۸/۵۰٪ احتمال وجود آلل C مشاهده شد، و برای گروه بیمار ۲۸٪ و ۷۲٪ به ترتیب برای آلل‌های A و C مشاهده شد. در این مقایسه اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل مشاهده شد (p-Value= 0.001, Mann-Whitney) (جدول ۳-۱۲ و نمودار ۳-۸).

جدول ۳-۱۳- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین ده

Allele/ Genotype IL-10 -592 A/C	Control n=100 F (%)	%	Patients n=200 F	%
A	83	41.5	112	28
C	117	58.5	288	72
AA	17	17	13	6.5
AC	49	49	86	43
CC	34	34	101	50.5



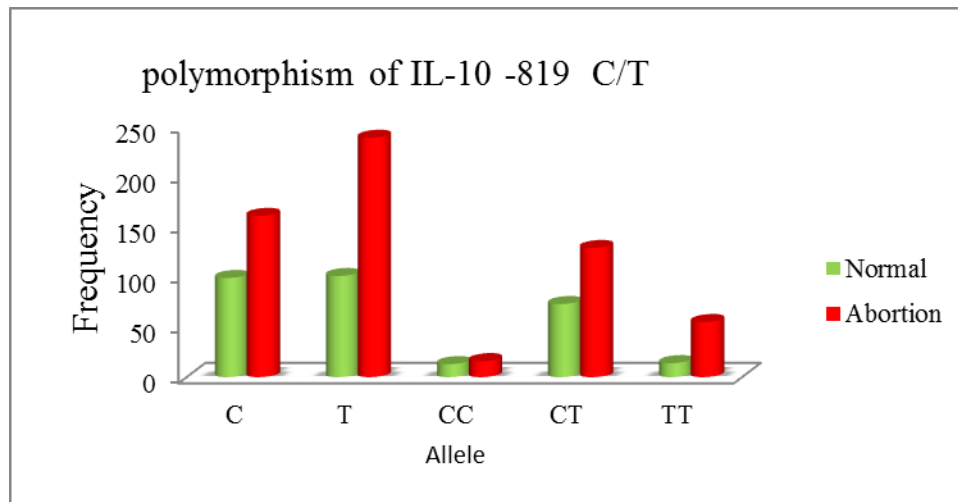
نمودار ۳-۸: مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین ده در موقعیت ۵۹۲-.

۳-۴-۵-۲- اینترلوکین ده در موقعیت ۸۱۹-

فراوانی آلل‌های C و T در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۴۹/۵۰٪ احتمال وجود آلل C و ۵۰/۵۰٪ احتمال وجود آلل T می‌باشد، و برای گروه بیمار ۴۰/۲۵ و ۵۹/۷۵ درصد بترتیب برای آلل‌های C و T. همچنین فرکانس ژنوتایپ‌های CC، TC و TT حاصله در این دو جمعیت نیز بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های C و T مشاهده شد -p (جدول ۳-۱۳ و نمودار ۳-۹) (Value= 0.006, Mann-Whitney)

جدول ۳-۱۴- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین ده

Allele/ Genotype IL-10 -819 T/C	Control n=100 F	%	Patients n=200 F	%
C	99	49.5	161	40.25
T	101	50.5	239	59.75
CC	13	13	16	8
CT	73	73	129	64.5
TT	14	14	55	27.5



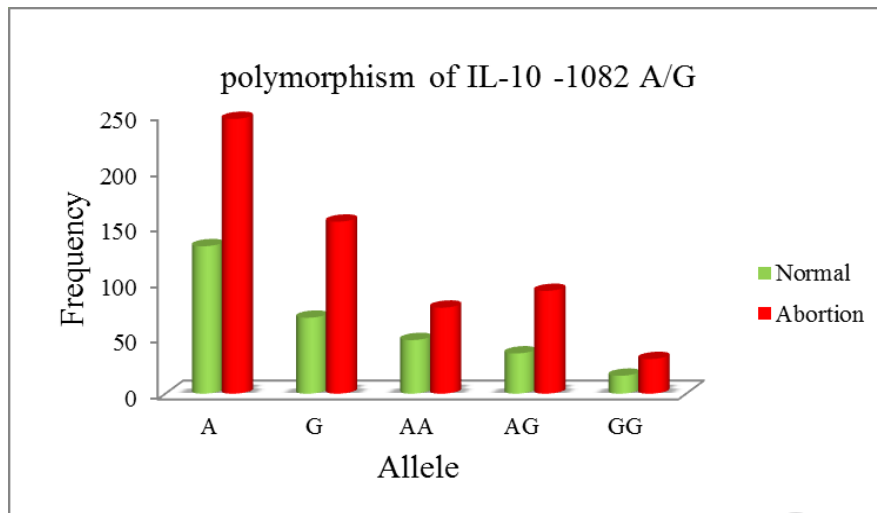
نمودار ۳-۹ - مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین ده در موقعیت ۸۱۹-.

۳-۴-۵-۳-۱۰۸۲- اینترلوکین ده در موقعیت

فراوانی آلل‌های A و G در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۶۶٪ احتمال وجود آلل A و ۳۴٪ احتمال وجود آلل G می‌باشد، و برای گروه بیمار ۶۱/۵ و ۳۸/۵۰ درصد بترتیب برای آلل‌های A و G. همچنین فرکانس ژنوتایپ‌های AA، AG و GG حاصله در این دو جمعیت نیز بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های G و A مشاهده نشد (p-Value = 0.236, Mann-Whitney) (جدول ۳-۱۴ و نمودار ۳-۱۰).

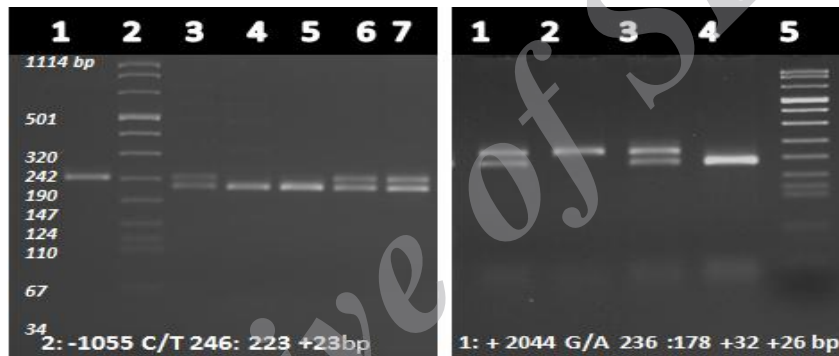
جدول ۳-۱۵ - مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین ده

Allele/ Genotype IL-10 -1082 A/G	Control n=100 F	%	Patients n=200	%
A	132	66	246	61.5
G	68	34	154	38.5
AA	48	48	77	38.5
AG	36	36	92	46
GG	16	16	31	15.5



نمودار ۳-۱۰ - مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین ده در موقعیت ۱۰۸۲-.

۳-۵-۵- پلی مورفیسم خانواده سیزده



(۲)

(۱)

شکل ۳-۱۳- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین سیزده:

(۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین سیزده موتاسیون **G/A +2044** با استفاده از آنزیم محدودالایتر **NlaIV** بر روی ژل آگارز ۳٪ (قطعه تکثیر شده ۲۳۶ جفت بازی): ۱ و ۳؛ هتروزیگوت / ۲؛ سالم / ۴؛ هموزیگوت بیمار / ۵؛ مارکر وزن مولکولی VIII.

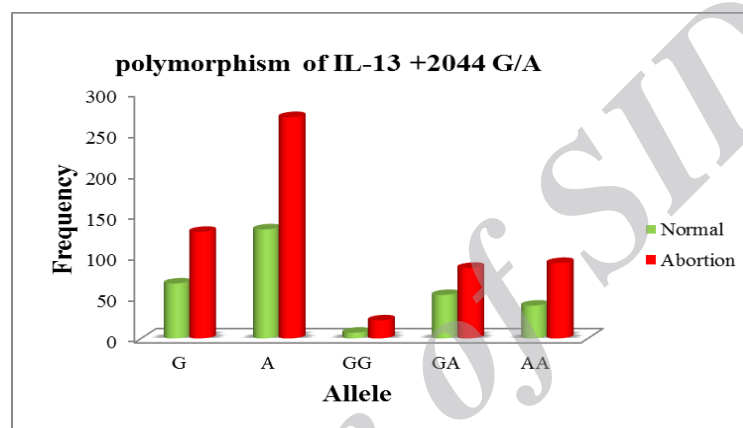
(۲) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین سیزده (**IL-13**) با استفاده از آنزیم محدودالایتر **BstUI** بر روی ژل آگارز ۳٪ (قطعه تکثیر شده ۲۰۹ جفت بازی): ۱- نرمال ۲- مارکر وزن مولکولی VIII / ۳، ۷؛ هتروزیگوت / ۴ و ۵؛ هموزیگوت.

۳-۵-۵-۱- اینترلوکین سیزده در موقعیت +۲۰۴۴

فراوانی آلل‌های **G** و **A** در ۲۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۳۳/۵۰٪ احتمال وجود آلل **G** و ۶۶/۵۰٪ احتمال وجود آلل **A** می‌باشد، و برای گروه بیمار ۳۲/۵ و ۶۷/۵۰ درصد بترتیب برای آلل‌های **G** و **A**. همچنین فرکانس ژنوتایپ‌های **AA** و **GA**، **GG** حاصله در این دو جمعیت نیز بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های **G** و **A** مشاهده نشد ($p\text{-Value} = 0.619$, Mann-Whitney) (جدول ۳-۱۴ و نمودار ۳-۱۱).

جدول ۳-۱۶- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین سیزده

Allele/ Genotype IL-13 +2044 G/A	Control n=100 F	%	Patients n=200 F	%
G	67	33.5	130	32.5
A	133	66.5	270	67.5
GG	7	7	22	11
GA	53	53	86	43
AA	40	40	92	46



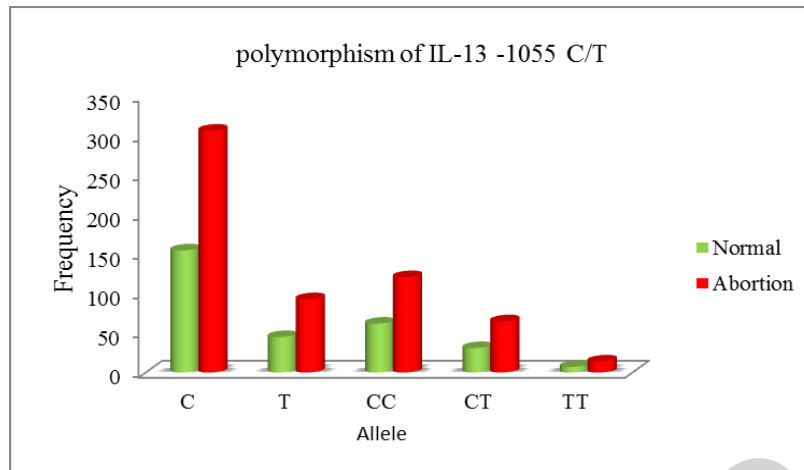
نمودار ۳-۱۱ - مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین سیزده در موقعیت ۲۰۴۴+.

۳-۵-۵-۲- اینترلوکین سیزده در موقعیت ۱۰۵۵-

فراوانی آلل‌های C و T در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۷۷/۵۰٪ احتمال وجود آلل C و ۲۲/۵۰٪ احتمال وجود آلل T می‌باشد، و برای گروه بیمار ۷۶/۷۵ و ۲۳/۲۵ درصد بترتیب برای آلل‌های C و T. همچنین فرکانس ژنوتایپ‌های CC، CT و TT حاصله در این دو جمعیت نیز بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های G و A مشاهده نشد (p-Value= 0.819, Mann-Whitney) (جدول ۳-۱۶ و نمودار ۳-۱۲).

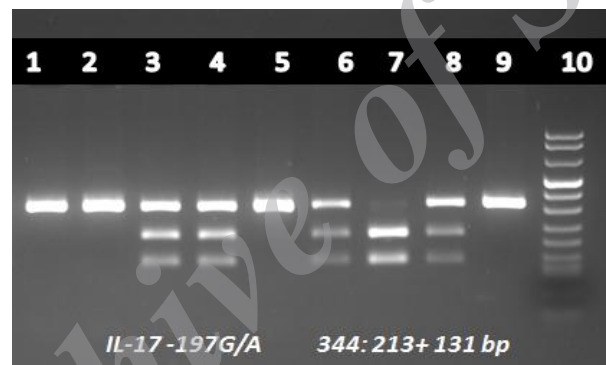
جدول ۳-۱۷- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین سیزده

Allele/ Genotype IL-13 -1055 C/T	Control n=100 F	%	Patients n=200 F	%
C	155	77.5	307	76.75
T	45	22.5	93	23.25
CC	62	62	121	60.5
CT	31	31	65	32.5
TT	7	7	14	7



نمودار ۳-۱۲- مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین سیزده در موقعیت ۱۰۵۵-.

۳-۵-۶- پلی مورفیسم اینترلوکین هفده



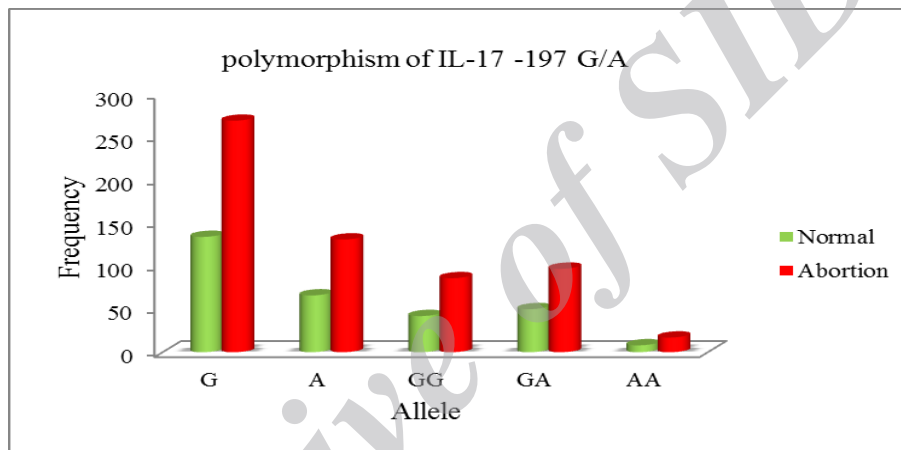
شکل ۳-۱۴- نتایج الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین هفده (IL-17):
 (۱) الکتروفورز پس از RFLP بر روی محصولات PCR پلی مورفیسم اینترلوکین هفده موتاسیون 197 G/A- با استفاده از آنزیم محدود-
 الاثر XmnI بر روی ژل آگارز ۲٪ (قطعه تکثیر شده ۳۴۴ جفت بازی): ۱، ۲، ۵، ۹ و ۳، ۴، ۶ و ۸ هتروزیگوت / ۷؛ هموزیگوت بیمار / ۱۰؛
 مارکر وزن مولکولی VIII.

۳-۵-۶-۱- اینترلوکین هفده در موقعیت ۱۹۷-

فراوانی آلل‌های G و A در ۲۰۰ بیمار و ۱۰۰ نفر جمعیت کنترل محاسبه و مقایسه شد. برای گروه کنترل ۶۷٪ احتمال وجود آلل G و ۳۳٪ احتمال وجود آلل A می‌باشد، و برای گروه بیمار ۶۷/۲۵ و ۳۲/۷۵ درصد بترتیب برای آلل‌های G و A. همچنین فرکانس ژنوتایپ‌های GG، GA و AA حاصله در این دو جمعیت نیز بررسی شد. اختلاف معنی‌داری بین گروه بیمار و کنترل در آلل‌های G و A مشاهده نشد (p-Value= 0.921, Mann-Whitney) (جدول ۳-۱۷ و نمودار ۳-۱۳).

جدول ۳-۱۸- مقایسه فرکانس آللی و ژنوتایپی اینترلوکین هفده

Allele/ Genotype IL-17 -197 G/A	Control n=100 F (%)	%	Patients n=200 F	%
G	134	67	269	67.25
A	66	33	131	32.75
GG	42	42	86	43
GA	50	50	97	48.5
AA	8	8	17	8.5



نمودار ۳-۱۳: مقایسه بین گروه بیمار و کنترل در فرکانس آللی و ژنوتایپی گیرنده اینترلوکین هفده در موقعیت ۱۹۷-.

۳-۶- نتایج بررسی‌های آماری

با توجه به نتایج مشاهده شده الکتروفورز محصول RFLP بر روی ژل آگارز ۲/۵ - ۴٪ ژنوتیپ هر فرد برای هر پلی‌مورفیسم مشخص شد.

پس از تعیین فراوانی ژنوتیپ‌ها برای هر دو گروه بیمار و کنترل، بررسی‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 13.00 بر روی اطلاعات بدست آمده انجام شد.

در ابتدا آزمون χ^2 برای سه حالت نرمال، هتروزایگوت و هموزایگوت در دو گروه شاهد و نمونه انجام گرفت (جدول ۳-۱۷). این آزمون تنها برای یک پلی‌مورفیسم اینترلوکین ۱۰ معنی‌دار بود ($p\text{-value} < 0/05$) (جدول ۳-۱۷).

پس از بدست آوردن فراوانی آلل‌ها برای این ۱۳ پلی‌مورفیسم در دو گروه نمونه و کنترل با استفاده از فراوانی سه حالت نرمال، هتروزایگوت و هموزایگوت این پلی‌مورفیسم‌ها در این دو گروه آزمون χ^2 برای فراوانی آلل‌ها نیز انجام گرفت. نتیجه آزمون برای اینترلوکین ده برای موتاسیون‌های ۵۹۲ A/C و ۸۱۹ T/C- اختلاف معنی‌دار بین دو گروه نرمال و بیمار بود ($p < 0/05$). خطر وقوع سقط مکرر با توجه به فراوانی آلل نرمال و موتانت در دو گروه نیز محاسبه شد (جدول ۳-۱۸).

جدول ۳-۱۹- بررسی فراوانی پلی‌مورفیسم‌های سایتوکاین‌ها بر اساس آزمون χ^2 برای سه حالت نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت در دو گروه شاهد و نمونه. n(%).

P-value	شاهد			نمونه			پلی‌مورفیسم‌ها
	هموزیگوت n(%).	هتروزیگوت n(%).	نرمال n(%).	هموزیگوت n(%).	هتروزیگوت n(%).	نرمال n(%).	
۰/۵۶۰	۸(۸)	۴۰(۴۰)	۵۲(۵۲)	(۱۸)۹	۸۵(۴۲,۵)	۹۷(۴۸,۵)	1beta-IL T/C +3954
۰/۵۹۶	۲۴(۲۴)	۴۹(۴۹)	۲۷(۲۷)	۴۵(۲۲,۵)	۱۰۷(۵۳,۵)	۴۸(۲۴)	IL_1beta C/T -31
۰/۶۰۰	۲۷(۲۷)	۵۳(۵۳)	۲۰(۲۰)	۵۱(۲۵,۵)	۱۰۳(۵۱,۵)	۴۶(۲۳)	1beta-IL C/T -511
۰/۴۲۰	۴(۴)	۳۹(۳۹)	۵۷(۵۷)	۹(۴,۵)	۸۷(۴۳,۵)	۱۰۴(۵۲)	IL-1RN A/T +9589
۰/۳۱۸	۷(۷)	۳۷(۳۷)	۵۶(۵۶)	۱۳(۶,۵)	۸۹(۴۴,۵)	۹۸(۴۹)	IL-1RN C / T +8061
۰/۸۸۷	۶(۶)	۳۱(۳۱)	۶۳(۶۳)	۹(۴,۵)	۶۸(۳۴)	۱۲۳(۶۱,۵)	IL-1RN T/C +11100
۰/۲۶۱	۴۱(۴۱)	۵۲(۵۲)	۷(۷)	۹۴(۴۷)	۹۷(۴۸,۵)	۹(۴,۵)	IL-6 G/C -174
۰/۰۰۱	۳۴(۳۴)	۴۹(۴۹)	۱۷(۱۷)	۱۰۱(۵۰,۵)	۸۶(۴۳)	۱۳(۶,۵)	IL-10 A/C -592
۰/۰۰۶	۱۴(۱۴)	۷۳(۷۳)	۱۳(۱۳)	۵۵(۲۷,۵)	۱۲۹(۶۴,۵)	۱۶(۸)	IL-10 T/C -819
۰/۲۳۶	۱۶(۱۶)	۳۶(۳۶)	۴۸(۴۸)	۳۱(۱۵,۵)	۹۲(۴۶)	۷۷(۳۸,۵)	IL-10 G/A -1082
۰/۶۱۹	۴۰(۴۰)	۵۳(۵۳)	۷(۷)	۹۲(۴۶)	۸۶(۴۳)	۲۲(۱۱)	IL-13 +2044 G/A
۰/۸۱۹	۷(۸۷)	۳۱(۳۱)	۶۲(۶۲)	۱۴(۷)	۶۵(۳۲,۵)	۱۲۱(۶۰,۵)	- IL-13 1055 C/T
۰/۹۲۱	۸(۸)	۵۰(۵۰)	۴۲(۴۲)	۱۷(۸,۵)	۹۷(۴۸,۵)	۸۶(۴۳)	IL-17 -197 G/A

داده‌های ما رتبه‌ای بود و بصورت نرمال، هتروزیگوت (یک ژن دچار موتاسیون) و یا همزیگوت بیمار (دو ژن دچار موتاسیون) است به همین دلیل از آزمون **Mann-Whitney** برای بررسی استفاده شد.

در بررسی مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره با استفاده از روش **Backward** برای پلی‌مورفیسم اینترلوکین ده موتاسیون‌های **592 A/C** و **819 C/T** و **1082 A/G** در مرحله اول موتاسیون **1082 A/G** - از مدل خارج شد و در مرحله دوم موتاسیون

819 C/T- از مدل خارج شد و مرحله سوم نشان می‌دهد، که موتاسیون A/C-592 در صورت هتروزیگوت بودن خطر سقط مکرر را ۲/۲۹۵ برابر می‌کند در حالی که هموزیگوت این خطر را به ۳/۸۸۵ برابر می‌رساند (جدول ۳-۱۹).

جدول ۳-۲۰- بررسی اثر وجود هر پلی مورفیسم بر وقوع سقط مکرر با استفاده از مدل رگرسیون لجستیک چند متغیره.

فاصله اطمینان ۹۵٪ ریسک خطر		ریسک خطر	p-value	پلی مورفیسم	مراحل رگرسیون
حد بالایی	حد پایینی				
			.035	-592 IL-10F	مرحله اول
10.229	1.046	3.271	.042	-592 Hetrozygote IL-10F	
13.529	1.420	4.383	.010	-592 Homozygote IL-10F	
			.086	IL-10F -819	
1.766	.175	.557	.320	IL-10F -819 Hetrozygote	
4.360	.363	1.258	.717	IL-10F -819 Homozygote	
			.436	IL-10F -1082	
2.302	.756	1.319	.330	IL-10F -1082 Hetrozygote	
1.858	.375	.835	.659	IL-10F -1082 Homozygote	
			.019	592 - IL-10F	مرحله دوم
11.677	1.253	3.825	.018	-592 Hetrozygote IL-10F	
14.889	1.621	4.912	.005	-592 Homozygote IL-10F	
			.099	IL-10F -819	
1.664	.170	.532	.278	IL-10F -819 Hetrozygote	
3.896	.342	1.154	.818	IL-10F -819 Homozygote	مرحله سوم
			.004	-592 IL-10F	
5.122	1.028	2.295	.043	592 Hetrozygote - IL-10F	
8.820	1.711	3.885	.001	592 Homozygote - IL-10F	

جدول ۳-۲۱- بررسی ارتباط بین انواع پلی مورفیسم های اینترلوکین ده با یکدیگر

IL10 -1082 A/G ضریب همبستگی (P-Value)	IL10 -819 C/T ضریب همبستگی (P-Value)	IL10 -592 A/C ضریب همبستگی (P-Value)	پلی مورفیسم	گروه
.349 (<0.001)	.355 (<0.001)		IL10 -592 A/C	کنترل
.259 (0.009)		0.355 (<0.001)	IL10 -819 C/T	
	.259 (0.009)	.349 (<0.001)	IL10 -1082 A/G	
.306 (<0.001)	.573 (<0.001)		IL10 -592 A/C	سقط مکرر
.203 (0.004)		.573 (<0.001)	IL10 -819 T/C	
	.203 (0.004)	.306 (<0.001)	IL10 -1082 A/G	



فصل چهارم بحث و پیشنهادات

Archive of SID

در این مطالعه ۱۳ پلی مورفیسم ژن‌های سایتوکاین‌ها در ۲۰۰ بیمار سقط مکرر و ۱۰۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفته است، که به طور کلی تنها در دو پلی مورفیسم اینترلوکین ده ارتباط با سقط مکرر دیده شد. برای اینترلوکین $IL-1\beta$ ، $IL-6$ ، $IL-13$ و $IL-17$ این بررسی اولین بار در جمعیت ایرانی انجام شده است در این ژن‌ها ارتباط معنی داری مشاهده شد.

۴-۱- پلی مورفیسم سایتوکاین‌های پیش التهابی در سندرم سقط مکرر

۴-۱-۱- پلی مورفیسم خانواده $IL-1\beta$

در سال ۲۰۰۱ Reid و همکارانش ارتباط معنی داری در بین دو گروه زنان با سندرم سقط مکرر و زنان سالم در موقعیت $C/T+3954$ از اینترلوکین یک بتا مشاهده نکردند. در سال ۲۰۰۲ Wang و همکارانش با بررسی سه پلی مورفیسم $IL-1\beta$ در دو موقعیت $C/T-511$ و $C/T-31$ به ارتباط معنی داری دست یافتند، در حالی که در موقعیت $C/T+3953$ ارتباط معنی داری مشاهده نکردند. در همان سال Hefler و همکاران با بررسی بر روی پلی مورفیسم $C/T-511$ ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسم و سقط مکرر نیافتند.

در این مطالعه، بررسی فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی در جمعیت زنان ایرانی دارای مشکل سقط مکرر (حداقل دارای سه سقط مکرر) به عنوان گروه بیمار و زنان نرمال (دارای دو بارداری موفق) به عنوان گروه کنترل، در موقعیت‌های $C/T+3954$ ، $C/T-511$ و $C/T-31$ ژن اینترلوکین یک بتا تفاوت معنی داری نشان نداد. این اختلاف می‌تواند به علت تفاوت‌ها در انتخاب بیماران و گروه شاهد و نیز شکل کلی ترکیب جمعیت ایرانی و همچنین تعداد موارد بررسی شده باشد.

۴-۱-۲- پلی مورفیسم در $IL-1RN$

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ توسط Unfrid و همکارانش در اتریش بر روی زنان مبتلا به سندرم سقط مکرر و زنان نرمال انجام دادند، ارتباط بین ژنوتیپ‌های گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک و شدت بیماری بررسی شد. در این مطالعه، واریان‌های آلی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک مورد بررسی قرار گرفت و ارتباط معنی داری در فرم‌های آلی بدست نیاموردند. این بررسی با استفاده از روش tandem repeats ($VNTR$) انجام شده است، در مطالعه‌ای که توسط Linjawi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در بریتانیا، انجام شد هیچ تفاوت آماری در توزیع پلی مورفیسم ژن $IL-1RN$ بین گروه بیمار و گروه کنترل مشاهده نشد و ارتباط این پلی-مورفیسم‌ها را با سقط مکرر رد کردند.

در مطالعه حاضر، به بررسی سه موتاسیون ($+9589$ ، $+8061$ و $+11100$) گیرنده آنتاگونیست اینترلوکین یک پرداخته شده است که در هیچ یک از این موتاسیون‌ها، اختلاف معنی دار آماری بین گروه کنترل و بیمار مشاهده نکردیم.

۴-۱-۳- پلی مورفیسم در اینترلوکین شش

$IL-6$ یک سایتوکاین تنظیمی ضد التهابی است که می‌تواند نقش مهمی در بیماری سقط مکرر داشته باشد. این سایتوکاین باعث مهار سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌شود (۵۸ و ۸۰).

در مطالعه‌ای که توسط Daher و همکارانش در سال ۲۰۰۳ در برزیل انجام شد، ارتباط بین پلی مورفیسم پروموتور $G/C-174$ در اینترلوکین ۶ و ارتباط آن با استعداد ابتلا به سندرم سقط مکرر بررسی شد. براساس این مطالعه هیچ گونه ارتباط معنی داری بین فراوانی بروز ژنوتیپ $IL-6$ در بیماران و گروه کنترل مشاهده نشد (۸۱)، در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۰۳ توسط Unfried و همکارانش انجام شد، پلی مورفیسم‌های ژن اینترلوکین ۶ در بیماران سندرم سقط مکرر مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه پلی مورفیسم آلل $G-IL-6$ در بیماران سقط مکرر مورد بررسی قرار گرفت، که براساس نتایج این مطالعه فراوانی آلل $G-IL-6$ معنی دار نبوده است ($P=0.7$) (۶۲). در مطالعه‌ی حاضر، در پلی مورفیسم $IL-6$ ، $G/C-174$ تفاوت معنی داری بین گروه بیمار و گروه کنترل مشاهده نکردیم.

^۱ variable number of tandem repeats

۴-۱-۴- پلی مورفیسیم اینترلوکین ده

در مطالعه‌ای که توسط Babbage و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در انگلیس انجام شده است، پلی مورفیسیم 1082 G/A- اینترلوکین ده در ۴۳ بیمار و ۵۸ کنترل بررسی شد، که تفاوت معنی‌داری بین گروه بیمار و گروه کنترل سالم مشاهده نکردند (۵۶).

مطالعه دیگری که توسط Karhukporpi و همکارانش در سال ۲۰۰۱ انجام شد، بین پلی مورفیسیم ژن IL-10 در موتاسیون 1082 G/A-، ارتباط بین این موتاسیون و سندرم سقط را تایید نکردند (۸۲). در سال ۲۰۰۵ کمالی و همکاران در یک مطالعه بر روی جمعیت ایرانی با بررسی سه پلی مورفیسیم IL-10 در موتاسیون 592 C/A-، به یک ارتباط معنی‌دار دست یافتند ($P=0.016$)، در دو موتاسیون 1089 G/A- و 819 C/T- ارتباط معنی‌داری پیدا نکردند (۵۵).

در جمعیت ایرانی مورد مطالعه ما، سه موقعیت پروموتوری ژن اینترلوکین ده مورد بررسی قرار گرفت، در دو پلی مورفیسیم 819 C/T و 592 C/A- اختلاف معنی‌دار مشاهده شد، اما در موتاسیون 1082 G/A- ارتباط معنی‌داری بین دو گروه بیمار و سالم مشاهده نگردید.

۴-۱-۵- پلی مورفیسیم اینترلوکین سیزده

در این زمینه مطالعه‌ای در مورد اثرات پلی مورفیسیم و سندرم سقط مکرر وجود ندارد. و ما به بررسی دو موتاسیون (۲۰۴۴+ و ۱۰۵۵-) اینترلوکین سیزده پرداخته‌ایم، که در هیچ یک از این موتاسیون‌ها، اختلاف معنی‌دار آماری بین گروه کنترل و بیمار مشاهده نشد.

۴-۱-۶- پلی مورفیسیم اینترلوکین هفده

همان‌طور که در فصل ۱ توضیح داده شد، اینترلوکین هفده از سلول‌های T کمکی به نام Th17، که نقش پیش‌التهابی دارند، تولید می‌شود. تمامی انواع IL-17 در پستانداران به خوبی حفظ شده‌اند، تا آنجاییکه ۶۲-۸۸٪ از اسیدهای آمینه بین موش و انسان مشابه‌اند (۸۳). اخیراً مطالعه‌ای در مورد بیان اینترلوکین هفده بر روی RSA انجام شده است که در این مطالعه نتایج به این صورت بوده که، تعادل بین Th17 / Treg در حاملگی طبیعی نقش مهمی داشته است. از طرفی Th17 نقش مهمی در رد آنتی ژن‌های conceptus بازی می‌کند در نتیجه می‌تواند برای حفظ بارداری مضر باشد (۸۴).

مطالعه‌ای بر روی پلی مورفیسیم IL-17A در مورد سقط مکرر انجام نشده است. در مطالعه ما اختلاف معنی‌داری بین پلی مورفیسیم IL-17A، موتاسیون 197 G/A- در بیماران سقط مکرر و افراد نرمال مشاهده نشد.

۴-۲- نتیجه‌گیری

انواع مختلفی از SNP ها در داخل نواحی کد کننده، داخل پروموتور و نواحی تنظیمی ژن سایتوکاین‌ها وجود دارد. از طرفی، بیان ۱ بسیاری از آلل‌های سایتوکاین‌ها در *in vivo* مطالعه شده است. بعضی از آلل‌ها موجب افزایش بیان ژن و بعضی دیگر موجب کاهش بیان سایتوکاین‌ها می‌شوند. در مطالعه حاضر ۱۳ موتاسیون ژن‌های سایتوکاین‌ها در ۲۰۰ بیمار سقط مکرر و ۱۰۰ فرد سالم مورد بررسی قرار گرفته است، که به طور کلی تنها در دو پلی مورفیسیم اینترلوکین ده ارتباط با سقط مکرر دیده شد. در پلی مورفیسیم اینترلوکین ده موتاسیون 592 A/C- وجود آلل هتروزایگوت ریسک سقط مکرر را ۲/۲۹۵ برابر وجود آلل هموزایگوت ریسک آنرا ۳/۸۸۵ برابر افزایش می‌دهد.

¹ expression

از آنجاییکه پایان هر بررسی و آزمایشی می‌تواند شروعی باشد برای مطالعات جدیدتر، لذا در انتها به پیشنهاداتی اشاره می‌شود که می‌توانند دیدگاه‌های جدیدی در رابطه با بهتر شدن مسیر پیدا کردن عوامل دخیل در سندرم سقط‌مکرر به ما ارائه دهند.

۳-۴- پیشنهادات

- ۱- در مطالعات اپیدمیولوژیکی، هر چه اندازه جمعیت مورد مطالعه بزرگتر باشد، نتایج آماری حاصله محکم‌تر و مستدل‌تر می‌باشد. از این رو افزایش تعداد بیماران می‌تواند بیانگر مطالعه دقیق‌تر این بیماران در ایران باشد.
- ۲- مطالعه پلی‌مورفیسم دیگر سایتوکاین‌ها، منجمله سایتوکاین‌های ضدالتهابی و به طور کلی پلی‌مورفیسم پروفایل کامل سایتوکاینی، می‌تواند دیدگاه وسیع‌تر و کامل‌تری را در مورد تفاوت‌های ژنتیکی بیماران ایرانی در مقایسه با افراد سالم در اختیار ما قرار دهد.

امیدواریم این تحقیق گامی باشد هر چند کوچک در جهت پیشرفت تحقیقات بعدی راجع به این بیماری در ایران، و آرزو مندیم که در آینده‌ای نزدیک علت و درمان این بیماری شناخته شود تا کسی بیش از این، از این بیماری در رنج و عذاب نباشد.

Archive of SID

پیوست‌ها

Appendix

Appendix 1: TAE 50X

Tris base 1 M (Merck/Germany): 121.24g

Acetic Acid Glacial (Merck/Germany): 28.5 ml

0.5 M EDTA, pH=8 (usb/USA): 50 ml

Distilled water: 500 ml

The above materials were dissolved in 400 ml distilled water, and then the volume is adjusted to 500 ml with additional distilled water.

Appendix 2: Loading buffer

Bromo phenol blue (Merck/Germany):0.125g

Sucrose (Sigma/USA):20g

Distilled water: 50 ml

Appendix 3: Marker VIII (DNA molecular weight marker 19-1114 bp)

Marker mix: 1 μ l (Roche/Germany)

Loading buffer: 1 μ l

Distilled water: 4 μ l

لیست علامت‌های اختصاری (Abbreviations):

PCR	Polymerase Chain Reaction
SPSS	Statistical package for social sciences
µg	Microgram
ml	Milliliters
µl	Micro litre
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reactive protein
EDTA	Ethylen diamine tetra-acetic acid
HCG	Human chorionic gonadoteropin
HLA	Human leukocyte antigen
INF	Interferon
IL	Interleukin
LH	Luteinzing hormone
NK-Cell	Natural killer cell
TGF	Transforming growth factor
Th	T-helper
TNF	Tumor Necrosis Factor
LPS	Lipopolysaccharide
VNTRs	variable number of tandem repeats
MHC	Major Histocompatibility complex
TCR	T Cell Receptor
PG	Prostaglandin
IL-Ra	Interleukin Receptor Antagonist
RSA	Recurrent Spantaneous Abortion
R	Receptor

References

- 1 Reddy, A.M.a.B.M. (2006) Aruna Meka and B. Mohan Reddy. *Int J Hum Genet*, 6(2), 109-117.
- 2 Lee, R.M. and Silver, R.M. (2000) Recurrent pregnancy loss: summary and clinical recommendations. *Seminars in reproductive medicine*, 18, 433-440.
- 3 Sierra, S. and Stephenson, M. (2006) Genetics of recurrent pregnancy loss. *Seminars in reproductive medicine*, 24, 17-24.
- 4 Traina, E., Daher, S., Moron, A.F., Sun, S.Y., Franchim, C.S. and Mattar, R. Polymorphisms in VEGF, progesterone receptor and IL-1 receptor genes in women with recurrent spontaneous abortion. *Journal of reproductive immunology*, 88, 53-57.
- 5 Lim, K.J., Odukoya, O.A., Li, T.C. and Cooke, I.D. (1996) Cytokines and immuno-endocrine factors in recurrent miscarriage. *Human reproduction update*, 2, 469-481.
- 6 Michels, T.C. and Tiu, A.Y. (2007) Second trimester pregnancy loss. *American family physician*, 76, 1341-1346.
- 7 Ghosh, K., Shetty, S., Vora, S. and Salvi, V. (2008) Successful pregnancy outcome in women with bad obstetric history and recurrent fetal loss due to thrombophilia: effect of unfractionated heparin and low-molecular weight heparin. *Clin Appl Thromb Hemost*, 14, 174-179.
- 8 Franssen, M.T., Korevaar, J.C., Leschot, N.J., Bossuyt, P.M., Knegt, A.C., Gerssen-Schoorl, K.B., Wouters, C.H., Hansson, K.B., Hochstenbach, R., Madan, K. *et al.* (2005) Selective chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: case-control study. *BMJ (Clinical research ed)*, 331, 137-141.
- 9 Stephenson, M.D., Awartani, K.A. and Robinson, W.P. (2002) Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17, 446-451.
- 10 Ogasawara, M., Aoki, K., Okada, S. and Suzumori, K. (2000) Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertility and sterility*, 73, 300-304.
- 11 Sullivan, A.E., Silver, R.M., LaCoursiere, D.Y., Porter, T.F. and Branch, D.W. (2004) Recurrent fetal aneuploidy and recurrent miscarriage. *Obstetrics and gynecology*, 104, 784-788.
- 12 Lee, C. and Slade, P. (1996) Miscarriage as a traumatic event: a review of the literature and new implications for intervention. *Journal of psychosomatic research*, 40, 235-244.
- 13 Kupferminc, M.J., Eldor, A., Steinman, N., Many, A., Bar-Am, A., Jaffa, A., Fait, G. and Lessing, J.B. (1999) Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *The New England journal of medicine*, 340, 9-13.
- 14 Devi Wold, A.S., Pham, N. and Arici, A. (2006) Anatomic factors in recurrent pregnancy loss. *Seminars in reproductive medicine*, 24, 25-32.
- 15 Propst, A.M. and Hill, J.A., 3rd. (2000) Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Seminars in reproductive medicine*, 18, 341-350.
- 16 Dosiou, C. and Giudice, L.C (۲۰۰۵). Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocrine reviews*, 26, 44-62.
- 17 SZCZEPAŃSKA m, R.m., LEWANDOWSKA dj , SKRZYPCZAK j. (2007) The influence of viral infection on fetal fibronectin and IL-6 expression in cervical mucus among women with fetal defects. 13(3).
- 18 Tulppala, M.a.Y.O. (1999) Current concepts in the pathogenesis of recurrent miscarriage. . *Curr Obstet & Gynaec*, 2-6.
- 19 Schon, M.P., Arya, A., Murphy, E.A., Adams, C.M., Strauch, U.G., Agace, W.W., Marsal, J., Donohue, J.P., Her, H., Beier, D.R. *et al.* (1999) Mucosal T lymphocyte numbers are selectively reduced in integrin alpha E (CD103)-deficient mice. *J Immunol*, 162, 6641-6649.
- 20 Stagnaro-Green, A., Roman, S.H Cobin, R.H EL-Horazy. (1990) Detection of at risk prgnancy by means of highly sensitive assays for thyroid autoantibodies. *JAMA*, 264.
- 21 Ljunggren, H.G. and Karre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*, 11, 237-244.

- 22 Zhou, Y., Fisher, S.J., Janatpour, M., Genbacev, O., Dejana, E., Wheelock, M. and Damsky, C.H. (1997) Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *The Journal of clinical investigation*, 99, 2139-2151.
- 23 Aoki, K., Kajiura S., and Matsumoto, Y.. (1995) Preconceptional natural - killer cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet*, 345.
- 24 Gupta, S., Agarwal, A., Banerjee, J. and Alvarez, J.G. (2007) The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical & gynecological survey*, 62, 335-347; quiz 353-334.
- 25 Abul, K.A., Andrew H, Lichman, Shir pillai. (2007) General Properties of Immune responses. Chapter I.
- 26 Hoebe, K., Janssen, E. and Beutler, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology*, 5, 971-974.
- 27 Choi, B.C., Polgar, K., Xiao, L. and Hill, J.A. (2000) Progesterone inhibits in-vitro embryotoxic Th1 cytokine production to trophoblast in women with recurrent pregnancy loss. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15 Suppl 1, 46-59.
- 28 Daher, S., Shulzhenko, N., Morgun, A., Mattar, R., Rampim, G.F., Camano, L. and DeLima, M.G. (2003) Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Journal of reproductive immunology*, 58, 69-77.
- 29 Reid, J.G., Simpson, N.A., Walker, R.G., Economidou, O., Shillito, J., Gooi, H.C., Duffy, S.R. and Walker, J.J. (2001) The carriage of pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol*, 45, 35-40.
- 30 Fraser, J.K., Lill, M.C. and Figlin, R.A. (1996) The biology of the cytokine sequence cascade. *Seminars in oncology*, 23, 2-8.
- 31 Balkwill, F.R. and Burke, F. (1989) The cytokine network. *Immunology today*, 10, 299-304.
- 32 Elias, J.A. and Zitnik, R.J. (1992) Cytokine-cytokine interactions in the context of cytokine networking. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 7, 365-367.
- 33 Kunkel, S., Standiford, T., Chensue, S.W., Kasahara, K. and Strieter, R.M. (1991) Cellular and molecular mechanisms of cytokine networking. *Agents and actions*, 32, 205-218.
- 34 Minasian, E. and Nicola, N.A. (1992) A review of cytokine structures. *Protein sequences & data analysis*, 5, 57-64.
- 35 Casciari, J.J., Sato, H., Durum, S.K., Fiege, J. and Weinstein, J.N. (1996) Reference databases of cytokine structure and function. *Cancer chemotherapy and biological response modifiers*, 16, 315-346.
- 36 Piccinni, M.P. (2007) T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss. *Reproductive biomedicine online*, 14 Spec No 1, 95-99.
- 37 Prigoshin, N., Tambutti, M., Larriba, J., Gogorza, S. and Testa, R. (2004) Cytokine gene polymorphisms in recurrent pregnancy loss of unknown cause. *Am J Reprod Immunol*, 52, 36-41.
- 38 Robertson, S.A., Seemark, R.F., Guilbert, L.J. and Wegmann, T.G. (1994) The role of cytokines in gestation. *Critical reviews in immunology*, 14, 239-292.
- 39 Hill, J.A., Polgar, K. and Anderson, D.J. (1993) CD4⁺T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *Jama*, 273, 1933-1936.
- 40 Huber, S.A., Kupperman, J. and Newell, M.K. (1999) Hormonal regulation of CD4(+) T-cell responses in coxsackievirus B3-induced myocarditis in mice. *Journal of virology*, 73, 4689-4695.
- 41 Stephensen, C.B., Jiang, X. and Freytag, T. (2004) Vitamin A deficiency increases the in vivo development of IL-10-positive Th2 cells and decreases development of Th1 cells in mice. *The Journal of nutrition*, 134, 2660-2666.
- 42 Raghupathy, R., Makhseed, M., Azizieh, F., Hassan, N., Al-Azemi, M. and Al-Shamali, E. (1999) Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cellular immunology*, 196, 122-130.

- 43 Gery, I., Gershon, R.K. and Waksman, B.H. (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *The Journal of experimental medicine*, 136, 128-142.
- 44 March, C.J., Mosley, B., Larsen, A., Cerretti, D.P., Braedt, G., Price, V., Gillis, S., Henney, C.S., Kronheim, S.R., Grabstein, K. *et al.* (1985) Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature*, 315, 641-647.
- 45 Steinkasserer, A., Spurr, N.K., Cox, S., Jeggo, P. and Sim, R.B. (1992) The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. *Genomics*, 13, 654-657.
- 46 Kumar, S., Kumar, A. and Dixit, V.K. (2009) Evidences showing association of interleukin-1B polymorphisms with increased risk of gastric cancer in an Indian population. *Biochemical and biophysical research communications*, 387, 456-460.
- 47 Wilkinson, R.J., Patel, P., Llewelyn, M., Hirsch, C.S., Pasvol, G., Snounou, G., Davidson, R.N. and Toossi, Z. (1999) Influence of polymorphism in the genes for the interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1beta on tuberculosis. *The Journal of experimental medicine*, 189, 1863-1874.
- 48 Dai, M.Z., Pan, Y.Q., Xu, D.P., Chen, X.J., Qian, R.J., Chen, D.H., Cui, T.W., Lin, A. and Yan, W.H. IL-1 receptor antagonist gene polymorphism in idiopathic recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population. *International journal of immunogenetics*.
- 49 Karhukorpi, J., Laitinen, T., Kivela, H., Tiilikainen, A. and Hurme, M. (2003) IL-1 receptor antagonist gene polymorphism in recurrent spontaneous abortion. *Journal of reproductive immunology*, 58, 61-67.
- 50 Attar, R., Agachan, B., Kucukhuseyin, O., Toptas, B., Attar, E. and Isbir, T. Association of interleukin 1beta gene (+3953) polymorphism and severity of endometriosis in Turkish women. *Molecular biology reports*, 37, 369-374
- 51 Garcia-Gonzalez, M.A., Lanas, A., Santolaria, S., Crusius, J.B., Serrano, M.T. and Pena, A.S. (2001) The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clinical and experimental immunology*, 125, 368-375.
- 52 Hu, S., Song, Q.B., Yao, P.F., Hu, Q.L., Hu, P.J., Zeng, Z.R. and Pang, R.P. (2005) No relationship between IL-1B gene polymorphism and gastric acid secretion in younger healthy volunteers. *World J Gastroenterol*, 11, 6549-6553.
- 53 Hall, S.K., Perregaux, D.G., Gabel, C.A., Woodworth, T., Durham, L.K., Huizinga, T.W., Breedveld, F.C. and Seymour, A.B. (2004) Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis and rheumatism*, 50, 1976-1983.
- 54 Simon, C., Piquette, G.N., Frances, A. and Polan, M.L. (1993) Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 77, 549-555.
- 55 Kamali-Sarvestani, E., Zolghadri, J., Gharesi-Fard, B. and Sarvari, J. (2005) Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. *Journal of reproductive immunology*, 65, 171-178.
- 56 Babbage, S.J., Arkwright, P.D., Vince, G.S., Perrey, C., Pravica, V., Quenby, S., Bates, M. and Hutchinson, I.V. (2001) Cytokine promoter gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Journal of reproductive immunology*, 51, 21-27.
- 57 Linjawi, S., Li, T.C., Laird, S. and Blakemore, A. (2005) Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta polymorphisms in women with recurrent miscarriage. *Fertility and sterility*, 83, 1549-1552.
- 58 Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J.S., Humphries, S. and Woo, P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 102, 1369-1376.
- 59 Medica I, O.S., Perez N, Kastrin A, Peterlin B. (2009) Association between genetic polymorphisms in cytokine genes and recurrent miscarriage--a meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*, 19, 406-414.

- 60 Saijo, Y., Yoshioka, E., Fukui, T., Kawaharada, M., Sata, F., Sato, H. and Kishi, R. (2007) H pylori seropositivity and cytokine gene polymorphisms. *World J Gastroenterol*, 13, 4445-4451.
- 61 Choi, Y.K. and Kwak-Kim, J. (2008) Cytokine gene polymorphisms in recurrent spontaneous abortions: a comprehensive review. *Am J Reprod Immunol*, 60, 91-110.
- 62 Unfried, G., Bocskor, S., Endler, G., Nagele, F., Huber, J.C. and Tempfer, C.B. (2003) A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18, 267-270.
- 63 Jasper, M.J., Tremellen, K.P. and Robertson, S.A. (2007) Reduced expression of IL-6 and IL-1alpha mRNAs in secretory phase endometrium of women with recurrent miscarriage. *Journal of reproductive immunology*, 73, 74-84.
- 64 de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G. and de Vries, J.E. (1991) Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes :an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 174, 1209-1220.
- 65 Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C. *et al* (1999). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and immunity*, 1, 3-19.
- 66 Kuby, J.K., Thomas J.; Goldsby, Richard A.; Osborne, Barbara A (2004) Kuby immunology. *San Francisco*, W.H. Freeman. pp. 396. ISBN 1-4292-0211-4.
- 67 McKenzie, A.N., Culpepper, J.A., de Waal Malefyt, R., Briere, F., Punnonen, J., Aversa, G., Sato, A., Dang, W., Cocks, B.G., Menon, S. *et al*. (1993) Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 3739-5.
- 68 Minty, A., Chalon, P., Derocq, J.M., Dumont, X., Guillemot, J.C., Kaghad, M., Labit, C., Leplatois, P., Liauzun, P., Miloux, B. *et al*. (1993) Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362, 2248-50.
- 69 Palikhe, N.S., Kim, S.H., Cho, B.Y., Choi, G.S., Kim, J.H., Ye, Y.M. and Park, H.S. IL-13 Gene Polymorphisms are Associated With Rhinosinusitis and Eosinophilic Inflammation in Aspirin Intolerant Asthma. *Allergy, asthma & immunology research*, 2, 134-140.
- 70 Wu, Y.M., Chuang, H.L., Ho, Y.P., Ho, K.Y. and Tsai, C.C. Investigation of interleukin-13 gene polymorphisms in individuals with chronic and generalized aggressive periodontitis in a Taiwanese (Chinese) population. *Journal of periodontal research*, 45, 695-701.
- 71 Tahara, T., Shibata, T., Nakamura, M., Yamashita, H., Yoshioka, D., Okubo, M., Yonemura, J., Maeda, Y., Maruyama, N., Kamano, T. *et al*. Association between IL-17A, -17F and MIF polymorphisms predispose to CpG island hyper-methylation in gastric cancer. *International journal of molecular medicine*, 25, 471-477.
- 72 Shibata, T., Tahara, T., Hirata, I. and Arisawa, T. (2009) Genetic polymorphism of interleukin-17A and -17F genes in gastric carcinogenesis. *Human immunology*, 70, 547-551.
- 73 Miossec, P., Korn, T. and Kuchroo, V.K. (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *The New England journal of medicine*, 361, 888-898.
- 74 Bugarski, D., Krstic, A., Vlaski, M., Petakov, M., Jovicic, G., Stojanovic, N. and Milenkovic, P. (2004) Interleukin-17-induced inhibitory effect on late stage murine erythroid bone marrow progenitors. *European cytokine network*, 15, 247-254.
- 75 Arisawa, T., Tahara, T., Shibata, T., Nagasaka, M., Nakamura, M., Kamiya, Y., Fujita, H., Nakamura, M., Yoshioka, D., Arima, Y. *et al*. (2008) The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *Journal of clinical immunology*, 28, 44-49.
- 76 Cochery-Nouvellon, E., Nguyen, P., Attaoua, R., Cornillet-Lefebvre, P., Mercier, E., Vitry, F. and Gris, J.C. (2009) Interleukin 10 gene promoter polymorphisms in women with pregnancy loss: preferential association with embryonic wastage. *Biology of reproduction*, 80, 1115-1120.
- 77 McDaniel, D.O., Barber, W.H., Nguyen, C., Rhodes, S.W., May, W.L., McDaniel, L.S., Vig, P.J., Jemeson, L.L. and Butkus, D.E. (2003) Combined analysis of cytokine genotype

- polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients. *Transplant immunology*, 11, 107-119.
- 78 Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot, F., Hardt, C. et al. (2001) Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. *Genes and immunity*, 2, 61-70.
- 79 Makhseed, M., Raghupathy, R., Azizieh, F., Omu, A., Al-Shamali, E. and Ashkanani, L. (2001) Th1 and Th2 cytokine profiles in recurrent aborters with successful pregnancy and with subsequent abortions. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16, 2219-2226.
- 80 Velez, D.R., Fortunato, S.J., Williams, S.M. and Menon, R. (2008) Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein concentrations in preterm birth. *Human molecular genetics*, 17, 1619-1630.
- 81 Daher S, S.N., Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, DeLima MG. (2003) Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *Journal of reproductive immunology*, 58, 69-77.
- 82 Karhukorpi, J., Laitinen, T., Karttunen, R. and Tiilikainen, A.S. (2001) The functionally important IL-10 promoter polymorphism (-1082G-->A) is not a major genetic regulator in recurrent spontaneous abortions. *Molecular human reproduction*, 7, 201-203.
- 83 Kolls, J.K. and Linden, A. (2004) Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21, 467-476.
- 84 Liu, Y.S., Wu, L., Tong, X.H., Wu, L.M., He, G.P., Zhou, G.X., Luo, L.H. and Luan, H.B. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol*, 65, 503-511.

Archive of SID

Abstract:

Recurrent spontaneous abortion (RSA) is defined as three or more consecutive pregnancy losses prior to the 20th week of gestation. Inflammatory cytokine cascades have been implicated in the pathogenesis of RSA. In early pregnancy, plasma levels of pro-inflammatory cytokines are higher, while the levels of anti-inflammatory cytokines are lower, in women who miscarry compared to those who have successful pregnancies. Research efforts have focused on studying single nucleotide polymorphisms (SNP) in candidate cytokine genes in RSA women. The aim of this study was to survey the frequency of the interleukin IL-1 β with mutation (-31 T/C, -511 C/T and +3954 C/T), IL-1RN (+9589 A/T, +8061 C/T and +11100 T/C), IL-6 with a mutation (-174 C/G), IL-10 (-592 A/C, -819 T / C and -1082 A/G), IL-13 (+2044 G/A and -1055 C/T) and IL-17 with a mutation (-197 G/A) gene promoter polymorphisms in Iranian women with RSA as compared to normal women.

In this case – control study, 200 women with at least three RSA as the case and 100 healthy women with a history of two successful deliveries, without any pregnancy complications, as the control groups, were selected. Blood samples were recruited from Avicenna Infertility Clinic, Tehran, Iran. Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) were performed to assess the frequency of the gene polymorphisms. The frequencies of the polymorphisms were calculated and compared between the case and the control groups.

The data showed significant differences in IL10 promoter gene polymorphism (-592 A/C and -819 C/T) frequencies between RSA women and controls. However there were not any significant differences in the frequencies of interleukin IL-1 β (-31 T / C, -511 C / T and +3954 C / T), IL-1RN (+9589 A/T, +8061 C/T and +11100 T/C), IL-6 (-174 C/G), IL-10 (-1082 A/G) IL-13 (+2044 G / A and -1055 C/T) and IL-17 -197 G/A polymorphisms between normal women and those suffering from RSA.

Keywords: Abortion, polymorphisms, Interleukin, Cytokine



**Islamic Republic of Iran
Academic Center for Education, Culture and Research
Avicenna Research Institute**

**Reproductive Biotechnology Research Center
Monoclonal Antibody Research Center
Nanobiotechnology Research Center**

Title:

Investigation on the association of cytokine gene mutations with recurrent miscarriage syndrome

Code: 1934-33

BY:

Mahmood Jedi-Tehrani (Ph.D)

Saeed Zarei (M.D.)

Date: 2014